

Entwicklung von Sonden zum *in vitro* Nachweis von
Protein-Protein-Interaktionen zwischen
5-Lipoxygenase (5-LO) und 5-Lipoxygenase
aktivierendem Protein (FLAP) mittels FRET im NIR-
Bereich

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Hanne Kempe
geboren am 04. April 1988 in Jena

November 2011

Gutachter:

- 1.: Prof. Dr. rer. biol. hum. Ingrid Hilger, Jena
- 2.: PD Dr. med. habil. Joachim Böttcher, Gera
- 3.: Prof. Dr. med. Dietmar Gottschild, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 12.11.2013

Abkürzungsverzeichnis

(c)DNA	(complementary) Desoxyribonukleinsäure
(m)RNA	(messenger) Ribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Ampere
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
Ak	Antikörper
ANCA	Anti-Neutrophilen-Zytoplasma-Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure(n)
A. dest.	Aqua destillata
BAA	Bisacrylamid
BCA	Bicinchonin-Säure
BJ	humane Vorhaut-Fibroblasten-Zelllinie
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C/EBP	cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymidine/Enhancer Binding Protein
c/s	counts/s
ca.	circa
Ca ²⁺	Calciumionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCD	charge coupled device
CDK	cyclin-dependent kinases (Cyklin abhängige Kinase)
CF	correction Factor
CO ₂	Kohlendioxid
COOH	Carbonsäure
COX	Cyclooxygenase
CPPs	cell-penetrating peptides
CRP	C-reaktives Protein
Ct	cycle threshold
CT	Computertomographie
Cy	Cyanine
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat-Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
Dtl.	Deutschland
DTT	Dithiothreitol

DY	Farbstoffe der Firma Dyomics GmbH
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em.	Emission
engl.	Englisch
etc.	et cetera
Ex.	Exzitation
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FLAP	5-Lipoxygenase aktivierendes Protein
FRI	fluorescence reflectance imaging
FSC	forward scatter
FSL	Farbstoffstammlösung
g	(milli, mikro) Gramm
h	Stunde(n)
Hb(O ₂)	(oxygeniertes) Hämoglobin
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HL-60	humane promyelozytische Leukämie-Zelllinie
HL-60eos	eosinophiler Phänotyp der HL60-Zelllinie
5-HPETE	5-S-Isomer der Hydroperoxyecosatetraenoat-Säure
HRP	horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICG	Indocyaningrün
IgG	Immunglobulin G
IMDM	Iscoe's Modifiziertes Dulbecco's Medium
k	kilo
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
(5)-LO	(5)-Lipoxygenase
LT	Leukotriene
m	milli
M	molare Masse (g/mol)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minuten
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Molekulargewicht
n	nano
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	nicht detektierbar
NA	numerische Apertur
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid

Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NHS	N-Hydroxy-Succinimid-Ester
NIR	near infrared (Nah-Infrarot)
NIRF	near infrared fluorescence
NTC	non-template-controle
p	pico
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase-chain-reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PET	Positron-Emissions-Computertomographie
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rb	Retinoblastom-Protein
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
ROI(s)	region(s) of interest
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur (= 25 °C)
s	Sekunden
s.	siehe
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SNR	signal-noise-ratio
SSC	side scatter
SPECT	Single-Positron-Emissions-Computertomographie
stim.	stimuliert
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-β1	transforming growth factor β1
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UK	United Kingdom
USA	United States of America
V	Volt
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
verd.	verdünnt
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
x g	x-fache Erdbeschleunigung (= 9,8 m/s ²)
ZNS	Zentrales Nervensystem
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ε	molarer Extinktionskoeffizient

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Die Entzündungsreaktion	3
2.2	Molekulare Bildgebung	7
2.3	Darstellung von Protein-Protein-Interaktionen mittels FRET	13
3	Zielstellung	17
4	Material und Methoden.....	19
4.1	Material.....	19
4.1.1	Geräte.....	19
4.1.2	Verbrauchs- und sonstige Materialien	20
4.1.3	Chemikalien	22
4.1.4	Puffer, Lösungen und Medien	24
4.1.5	Software	26
4.1.6	Fluoreszenzfarbstoffe.....	26
4.1.7	Antikörper	28
4.1.8	Primer.....	29
4.1.9	Proteine	29
4.1.10	Zelllinien	30
4.1.10.1	HL-60eos-Zellen.....	30
4.1.10.2	BJ-Zellen	30
4.2	Methoden.....	31
4.2.1	Zellkultur.....	31
4.2.1.1	Kultivierung der Zellen	31
4.2.1.2	Passagieren von Zellen	31
4.2.1.3	Zellzahlbestimmung	32
4.2.1.4	Stimulation von Zellen.....	32
4.2.2	Herstellung der Sonden.....	32
4.2.2.1	Kopplungsreaktion	32
4.2.2.2	Aufreinigung der Sonden	33
4.2.2.2.1	Größenausschlusschromatografie mittels Sephadex-Säule.....	33
4.2.2.2.2	Ultrafiltration.....	34
4.2.2.3	Spektrophotometrische Analyse der Sondenlösungen.....	34
4.2.3	Ermittlung der Sondenstabilität	34
4.2.4	Fixierung der Proben auf Membranen.....	35
4.2.4.1	Nitrocellulosemembran	35
4.2.4.2	PVDF-Membran	36
4.2.5	Darstellung von Farbstoffen und Sonden mittels Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Kleintier-Scanner	36
4.2.5.1	Aufbau und Funktionsweise des Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Scanners.....	36
4.2.5.2	Auswertung der Aufnahmen	37

4.2.5.3	Detektion der Fluorophore und Nachweis des FRET-Effekts <i>in vitro</i>	38
4.2.6	Nachweis der Bindungsfähigkeit der Sonden mittels Dot Blot	40
4.2.7	Proteinfärbungen	41
4.2.7.1	Ponceau-Rot-Färbung	41
4.2.7.2	Amidoschwarz-Färbung.....	42
4.2.7.3	Coomassie-Färbung.....	42
4.2.7.4	SYPRO®-Ruby.....	42
4.2.8	Expressionsnachweis von 5-LO und FLAP in HL-60eos- und BJ-Zellen.....	43
4.2.8.1	Expressionsnachweis auf mRNA-Ebene	43
4.2.8.1.1	RNA-Isolation.....	43
4.2.8.1.2	Reverse Transkription.....	43
4.2.8.1.3	Quantitative Real-Time-PCR	44
4.2.8.1.4	Agarosegel-Elektrophorese	48
4.2.8.2	Expressionsnachweis auf Proteinebene.....	48
4.2.8.2.1	Proteinisolation mittels RIPA-Lysepuffer	48
4.2.8.2.2	Detergentienbasierte Membranproteinisolation nach Vellonen et al. .	49
4.2.8.2.3	Gesamtproteinbestimmung mittels BCA-Test	49
4.2.8.2.4	SDS-PAGE.....	50
4.2.8.2.5	Western Blot und Immunfärbung	51
4.2.8.2.6	Durchflusszytometrie	52
4.2.9	Mikroskopische Darstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden in HL-60eos- und BJ-Zellen	55
4.2.9.1	Herstellung von Poly-L-Lysin beschichteten Chamber Slides™	55
4.2.9.2	Immunozytologische Färbung der Zellen.....	55
4.2.9.3	Detektion der spezifischen FLAP-bzw. 5-LO-Sonden mittels Lichtmikroskopie	56
4.2.10	Statistische Analyse.....	60

5 Ergebnisse 61

5.1	FRET-Eigenschaften der Fluorophore DY-505, DY-682, DY-782.....	61
5.2	Analyse der Modell-Sonden	63
5.2.1	Optimierung des Kopplungsverhältnisses.....	63
5.2.2	Optimierung der Aufreinigungsmethoden.....	64
5.2.3	Ermittlung des molaren Detektionslimits	65
5.2.4	Untersuchung der Sondenstabilität	66
5.2.5	Nachweis der Bindungsfähigkeit der Modell-Sonden mittels Dot Blot	67
5.3	Analyse der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden	68
5.3.1	Herstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden.....	68
5.3.2	Untersuchung der Fluoreszenzintensität der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden.....	69
5.3.3	FRET-Eigenschaften der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden	70
5.3.4	Nachweis der Bindungsfähigkeit der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden ..	72
5.4	Expressionsnachweis von 5-LO und FLAP in HL-60eos- und BJ-Zellen.....	75
5.4.1	Expressionsnachweis von 5-LO in HL-60eos- und BJ-Zellen.....	75
5.4.1.1	Expressionsnachweis von 5-LO auf mRNA-Ebene.....	75
5.4.1.2	Expressionsnachweis von 5-LO auf Proteinebene	77

5.4.2	Expressionsnachweis von FLAP in HL-60eos- und BJ-Zellen	80
5.4.2.1	Expressionsnachweis von FLAP auf mRNA-Ebene	80
5.4.2.2	Expressionsnachweis von FLAP auf Proteinebene	82
5.5	Mikroskopische Darstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden in HL-60eos- und BJ-Zellen	85
6	Diskussion	89
7	Schlussfolgerungen und Ausblick	110
8	Literaturverzeichnis	I
9	Anhang.....	VIII
9.1	Lebenslauf	VIII
9.2	Danksagung	IX
9.3	Eidesstattliche Erklärung	XI

1 Zusammenfassung

Entzündungsprozesse spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese unzähliger Krankheitsbilder wie Artherosklerose, Morbus Crohn, Allergien sowie in der Tumorentstehung. Die Ursache hierfür ist oftmals in einem Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren zu sehen, deren Funktion die Modulation von Entzündungsreaktionen auf zellulärer sowie auf humoraler Ebene ist. Eine zentrale regulatorische Rolle nehmen Leukotriene ein, welche als Entzündungsmediatoren unter anderem die Aktivierung von Immunzellen bewirken, an der Veränderung von Gefäßpermeabilität und -tonus beitragen und die Synthese weiterer Mediatoren modulieren. Die Hemmung der Leukotriensynthese ist hierbei zentraler Ansatzpunkt unzähliger antiinflammatorischer Medikamente, welche aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit klinisch etabliert sind. Die derzeit angewandten Verfahren zur Diagnostik von Entzündungsprozessen wie die Untersuchung von Blutparametern und der Einsatz von CT bzw. MRT sind hingegen aufgrund ihrer z.T. unsicheren Aussagekraft, mangelnder Beschreibung von Lokalisationen sowie der zeitlich verzögerten Detektion weniger effektiv. Im Gegensatz zu diesen angewandten diagnostischen Werkzeugen könnte ein Nachweis der Leukotriensynthese im Rahmen der molekularen Bildgebung nicht invasiv und patientenschonend unter Darstellung der exakten Lokalisation der Inflammation eine frühzeitigere Diagnose entzündlicher Erkrankungen ermöglichen. Grundlegendes Prinzip der molekularen Bildgebung ist hierbei die Verwendung von Kontrastmitteln, welche durch die Markierung bestimmter Liganden wie Antikörper mit signalgebenden Komponenten (z.B. Fluorophore) entstehen (= Sonde) und dem Nachweis nach Bindung an entsprechende Zielstrukturen unter Verwendung eines geeigneten Detektionssystems dienen. Bisherige Ansätze zur Detektion von Inflammationsherden auf molekularer Ebene beruhten hierbei auf dem Expressionsnachweis von am Entzündungsgeschehen beteiligten Rezeptoren und Proteinen. Mittels optischer Bildgebung sind jedoch unter Ausnutzung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) auch Aussagen hinsichtlich der Aktivität und Wechselwirkungen von Proteinen möglich. Das in dieser Arbeit entwickelte auf dem FRET-Effekt basierende SONDENSYSTEM zur Darstellung eines in der Biosynthese der Leukotriene im Rahmen eines akuten Entzündungsgeschehens obligaten Zwischenschritts - der Aktivierung der 5-Lipoxygenase (5-LO) durch das 5-Lipoxygenase-aktivierende Protein (FLAP) - bietet daher die Möglichkeit zur exakten, dynamischen Darstellung eines akuten Entzündungsgeschehens. Hierzu wurden Sonden durch die Kopplung der NIR-Fluorophore DY-505, DY-682 sowie DY-782 an gegen 5-LO bzw. FLAP gerichtete Antikörper hergestellt und *in vitro* untersucht. Zunächst erfolgte hierbei die

Bestätigung der ausgewählten NIR-Farbstoffe als positiv hinsichtlich des FRET-Effekts. Die Optimierung der Sondenherstellung sowie eine orientierende Charakterisierung erfolgte anschließend an Modell-Sonden aus den genannten NIR-Fluorophoren und rabbit-serum-Immunglobulinen, welche hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften, Stabilität und Bindungsfähigkeit analysiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Sonden optimalerweise bei 6fachem Überschuss der Fluorophor- gegenüber den Antikörpermolekülen gekoppelt, anschließend mittels Ultrafiltration aufgereinigt und aufgrund der nachlassenden Sondenstabilität nur bis zur 3. Woche nach Herstellung eingesetzt werden sollten. Multi-spektrale Vermessungen der Modell-Sonden auf Membranen ermöglichten weiterhin aufgrund von Fluoreszenzauslöschungsphänomenen (Quenching) die Ermittlung von 0,01 nmol/Spot als optimal zur Sondendarstellung. In einem nächsten Schritt wurden die spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden durch die Kopplung der NIR-Fluorophore an Rabbit-anti-human-5-LO bzw. -FLAP hergestellt und ebenfalls hinsichtlich ihrer Funktionalität analysiert. So konnte der FRET-Effekt zwischen DY-682 und DY-782 auch in Anwesenheit von Antikörpern bestätigt werden, während ein eindeutiger Nachweis der Bindungsfähigkeit der hergestellten spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden nicht gelang. Zur Entwicklung eines geeigneten Zellmodells für die *in vitro* Versuche konnten die eosinophilen Granulozyten HL-60eos sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene als positiv hinsichtlich einer Expression von 5-LO und FLAP identifiziert werden, während sich die BJ-Zellen (Fibroblasten) diesbezüglich als Negativzelllinie bestätigten. Bei der nachfolgend durchgeführten mikroskopischen Darstellung der FRET-Sonden *in vitro* wurde eine spezifische Bindung der FLAP- bzw. 5-LO-Sonden an ihr intrazelluläres Target-Protein festgestellt. Weiterhin konnte mittels der orientierenden mikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden, dass grundlegende Parameter für einen FRET-Effekt auch in Zellen gegeben sind, wobei die Bestätigung eines solchen Energietransfers in Zellen unter Ausnutzung alternativer Detektionssysteme noch aussteht. Es wurde somit gezeigt, dass die hergestellten Sonden zur Darstellung von Protein-Interaktionen im Rahmen der Leukotrienbiosynthese grundsätzlich geeignet sind. Nach fortführenden *in vitro*- sowie *in vivo*-Untersuchungen zur Analyse der Spezifität, Sensitivität, Zytotoxizität und des FRET-Effekts sowie zur Suche nach einem geeigneten Mechanismus zum Transfer der Sonde in den zytoplasmatischen Raum *in vivo* könnte dieses SONDENSYSTEM somit gemeinsam mit weiteren entzündungsspezifischen Sonden als multifaktorielles optisches Kontrastmittel eingesetzt werden. So ist zukünftig eine Detektion und Lokalisation von Inflammationen zur frühzeitigen Diagnose und Therapie v.a. degenerativ-entzündlicher Erkrankungen wie z.B. Rheuma oder Morbus Bechterew möglich womit eine erhebliche Steigerung von Lebensqualität und -erwartung der Patienten bewirkt werden könnte.

2 Einleitung

2.1 Die Entzündungsreaktion

„Eine Entzündung ist die komplexe Abwehrreaktion des Organismus auf bestimmte Reize mit dem Ziel, das auslösende Agens und seine Folgen zu beseitigen“ ⁽¹⁾.

Neben exogenen Reizen mit physikalischer und chemischer Gewebsschädigung (Reibung, extreme Hitze/ Kälte, Strahlung, Säuren/ Basen) und Mikroorganismen können auch autogene Noxen (z.B. Autoantikörper) die Ursache einer Entzündung darstellen. Die Einteilung von Entzündungen kann nach Dauer und Verlauf der Reaktion in perakut, akut, chronisch und rezidivierend sowie nach ihrer Ausdehnung in lokal und systemisch erfolgen. Als klassische Zeichen einer lokalen Entzündungsreaktion gelten auch heute, etwa 2000 Jahre nach der Erstbeschreibung durch Celsus und Galenos, noch Rubor (= Rötung), Calor (= Überwärmung), Tumor (= Schwellung), Dolor (= Schmerz) und Functio laesa (= eingeschränkte Funktion), welche jedoch nicht bei jedem Inflammationsprozess direkt erkennbar und nachweisbar sein müssen ⁽²⁾. Neben einer lokalen Antwort auf das auslösende Agens kann ein gewisser Schweregrad des Inflammationsprozesses auch zu weiteren allgemeinen Reaktionen des Gesamtorganismus führen. Die Vermehrung von Leukozyten im Blut, eine gesteigerte Synthese von Akute-Phase-Proteinen wie des C-reaktiven Proteins, erhöhte Antikörperbildung sowie das Auftreten von Fieber sind unspezifische Zeichen einer solchen systemischen Entzündungsreaktion, welche bis zum Zusammenbruch der Organfunktionen und zum Tod führen können ⁽³⁾. Daher ist eine exakte Regulation des empfindlichen Gleichgewichts zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren nötig, um die komplexen Mechanismen zu Gunsten einer kontrollierten Abwehr unter Vermeidung unerwünschter Gewebsschädigungen zu steuern. Die hohe Beteiligung inflammatorischer Prozesse in der Pathogenese vieler anderer Erkrankungen ist ein Ausdruck der Anfälligkeit dieses Gleichgewichts.

So beruhen beispielsweise sowohl Allergien als auch septische Krankheitsbilder auf überschießenden Reaktionen des Immunsystems auf Allergene bzw. Mikroorganismen, welche zu Entzündungsprozessen im Gewebe führen. Inflammatorische Komponenten konnten weiterhin in artherosklerotisch veränderten Gefäßen durch einen Anstieg von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen sowie die Rekrutierung von Leukozyten beobachtet werden ⁽⁴⁾. Ferner entsteht die große Gruppe chronisch-entzündlicher Erkrankungen durch die Persistenz der auslösenden Noxe, im Rahmen von Autoimmunerkrankungen oder bei einer unvollständigen oder ineffektiven Defektheilung. Dies führt zu einer systemischen bzw. organspezifischen chronischen Entzündung, welche eine dauerhafte Schädigung des

Organismus zur Folge hat. Wichtige Vertreter dieser Kategorie von Erkrankungen stellen die Multiple Sklerose mit Entzündungen im Bereich des ZNS, die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, Asthma, die Wegener Granulomatose als generalisierte Vaskulitis sowie alle Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises dar. Gemeinsam sind ihnen neben dem zugrunde liegenden Inflamationsprozess die oftmals unspezifischen Symptome zu Erkrankungsbeginn, frühzeitige Erstmanifestationen, eine steigende Inzidenz sowie mangelhafte Therapieoptionen und -erfolge ⁽⁵⁾.

Weiterhin ist die bereits 1863 von Virchow aufgestellte Hypothese der Tumorentstehung auf der Basis von Entzündungsprozessen ⁽⁶⁾, nicht zuletzt aufgrund der Assoziation von 20 % aller Krebstodesfälle mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen, heutzutage weithin anerkannt ⁽⁷⁾. Die exakten zellulären sowie molekularen Prozesse der entzündungsbedingten Tumorgenese konnten trotz zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten auch heutzutage noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Entzündungsprozesse scheinen jedoch nach neuesten Untersuchungen gastrointestinaler Tumoren die Generation eines kanzerogenen Milieus durch die Begünstigung von DNA-Schäden und der veränderten Gentranskription proliferativer und apoptotischer Signale zu fördern ^(8, 9). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass auch Tumorzellen die Fähigkeit der Zytokin- und Chemokinproduktion besitzen und somit eine Rekrutierung von Leukozyten bewirken können ⁽⁶⁾. Diese Leukozyten durchlaufen anschließend noch unbekannte Wandlungsprozesse und fördern nachfolgend mittels gebildeter Entzündungsmediatoren zusätzlich die Proliferation entarteter Zellen ^(10, 11).

Trotz dieser zentralen Rolle von Entzündungsprozessen in der Pathogenese unterschiedlicher Krankheitsbilder mit verschiedensten klinischen Manifestationen beruhen Inflammationen stets auf der zellulären und humoralen Immunantwort des Organismus. ¹² beschreiben auf zellulärer Ebene vier verschiedene Phasen einer ablaufenden Entzündungsreaktion, welche der Zerstörung und Beseitigung der schädigenden Noxe, der Unterbindung ihrer Ausbreitung sowie der Einleitung der Reparatur eingetretener Schäden dienen. Infolge der Gewebsschädigung durch das auslösende Agens erfolgt in Phase I die Aktivierung lokaler Abwehrzellen (vorrangig Gewebsmakrophagen und –monozyten), welche - sofern möglich - mit der sofortigen Vernichtung des Erregers beginnen und zeitgleich Botenstoffe wie Zytokine und Chemokine freisetzen. Zu den vielfältigen Wirkungen dieser Entzündungsmediatoren gehören neben der Rekrutierung weiterer Abwehrzellen und der allgemeinen Aktivierung des Immunsystems auch die lokale Vasodilatation sowie die

Steigerung der Gefäßpermeabilität. Dadurch werden die zentralen Voraussetzungen für die in Phase II stattfindende Diapedese der angelockten Granulozyten aus dem Blut ins Entzündungsgebiet geschaffen. Die erfolgreich in das inflammatorisch aktive Gewebe emigrierten, vorrangig neutrophilen Zellen erzielen anschließend durch die Sekretion ihrer Granula eine weitere Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut. Die III. Phase der Entzündung ist vor allem durch die phagozytotische Beseitigung der auslösenden Noxe und der nachfolgenden, von aktivierten Makrophagen induzierten Apoptose der insgesamt nur sehr kurzlebigen neutrophilen Zellen gekennzeichnet. Kurz vor ihrem Absterben produzieren die Neutrophilen jedoch noch verschiedene Signalstoffe, welche die Rekrutierung weiterer Makrophagen und Monozyten in das Entzündungsgebiet fördern und zeitgleich die Migration von Granulozyten in das Gewebe unterbinden. Die Phase IV von Entzündungsreaktionen steht im Dienste der Wundheilung und wird durch die Phagozytose der apoptotischen Neutrophilen sowie die Freisetzung weiterer Mediatoren durch die angelockten Makrophagen mit dem Ziel der Aktivierung lokaler Fibroblasten und Keratinozyten bestimmt (¹²).

Auf humoraler Ebene nehmen vor allem die Eikosanoide eine zentrale Rolle in der Regulation von Inflammationen ein. Sie sind neben dem Hervorrufen von Fieber und Schmerzen als typische Begleitmerkmale der akuten Entzündung auch an der Vasokonstriktion bzw. -dilatation und der gesteigerten Permeabilität der geschädigten Gefäße beteiligt. Zu dieser Gruppe ungesättigter Fettsäuren gehören die Prostaglandine, Prostacycline, Thromboxane und Leukotriene, welche allesamt nicht gespeichert, sondern im Bedarfsfall *de novo* synthetisiert werden. Die Stimulation der Zellen zur Produktion von Eikosanoiden im Rahmen von Entzündungsprozessen kann hierbei zum einen Rezeptor-vermittelt durch Zytokine, bakterielle Peptide oder Immunkomplexe mit nachfolgendem Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen sowie durch die allgemeine Zellaktivierung in Folge unspezifischer mechanischer, physikalischer oder chemischer Reize erfolgen (¹³). Die Eikosanoidbiosynthese erfolgt hierbei entsprechend der

Abbildung **2.1** aus Phospholipiden der Zellmembran über den Arachidonstoffwechsel.

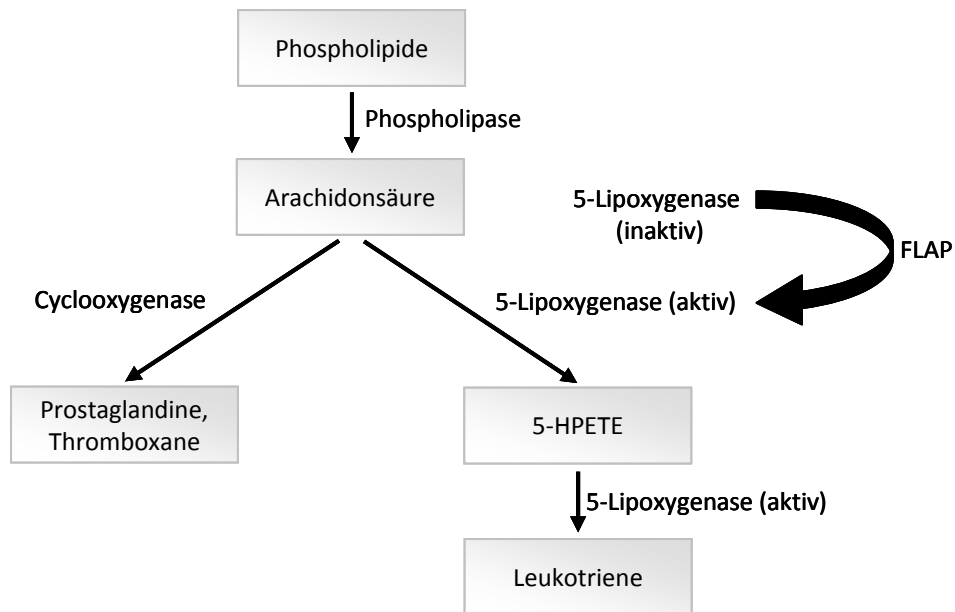


Abbildung 2.1 Eikosanoidbiosynthese unter Darstellung ausgewählter Zwischenprodukte und der hierfür benötigten Enzyme. Zunächst erfolgt die Synthese von Arachidonsäure aus Phospholipiden durch die Phospholipase. Diese kann nun mittels Cyclooxygenase zu Prostaglandinen und Thromboxanen oder durch die 5-Lipoxygenase über 5-HPETE (5-S-Isomer der Hydroperoxyeicosatetraenoat-Säure) in Leukotriene umgewandelt werden.

Mittels Ca^{2+} -abhängiger enzymatischer Spaltung durch die Phospholipase A_2 erfolgt zunächst die Freisetzung der Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden, wobei Lecithin und Phosphatidylinositol als bedeutendste Lieferanten der Phospholipide fungieren. Die Arachidonsäure wird nachfolgend durch die zwei zentralen Enzyme der Eikosanoidbiosynthese (Cyclooxygenase und Lipoxygenase) in diese bioaktiven Lipide umgewandelt ⁽¹⁴⁾. Die Metabolisierung der Arachidonsäure kann zum einen mittels der Cyclooxygenase (COX) am Endoplasmatischen Retikulum in Prostaglandin G_2 erfolgen, welches anschließend über eine Peroxidase in Prostaglandin H_2 umgewandelt wird. Dieses instabile Zwischenprodukt wird in einem nächsten Schritt in Produkte der drei Wirkstoffgruppen Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane umgesetzt ⁽¹⁵⁾. Andererseits können aus der Arachidonsäure auch durch die Einwirkung des Enzyms 5-Lipoxygenase (5-LO) Leukotriene synthetisiert werden. Die Überführung der primär inaktiv im zytosolischen Raum vorliegenden 5-LO in ihre aktive Form wird hierbei durch die Translokation des Enzyms in perinukleäre Bereiche aufgrund einer Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration eingeleitet ⁽¹⁶⁾. Die anschließende, erstmals 1990 von Dixon beschriebene, oligate Interaktion mit dem zellkernmembranständigen 5-Lipoxygenase-aktivierenden Protein (FLAP) führt zur endgültigen Aktivierung der 5-LO, welche nun über das als Zwischenprodukt gebildete 5-S-Isomer der Hydroperoxyeicosatetraenoat-Säure (5-HPETE) das Leukotrien A_4

synthetisiert (¹⁷, ¹⁸). Dieses kann nun enzymabhängig in andere Leukotriensubtypen (LTB₄, LTC₄, etc.) umgewandelt werden, welche als Mediatoren in Entzündungsprozessen verschiedenste Wirkungen entfalten (¹⁹).

Welcher Syntheseweg letztendlich beschritten wird und zur Herstellung welches Eikosanoidproduktes es somit in letzter Konsequenz kommt ist abhängig vom Typ und der Aktivierung der Zellen. So wird die 5-LO beispielsweise lediglich in bestimmten, aus dem Knochenmark stammenden Zellen wie Neutrophilen, Eosinophilen, Monozyten und Makrophagen exprimiert (²⁰, ²¹). Trotz der Existenz der 5-LO sind die meisten dieser myeloiden Zellen aufgrund der Abwesenheit anderer spezifischer Leukotriensynthasen jedoch nicht zur Synthese aller Leukotriene befähigt (¹³). Andererseits konnte bereits 1986 durch Feinmark in Endothelzellen unter Abwesenheit der 5-LO das Vorkommen des Leukotrien C₄ beobachtet werden, welches nach der Aufnahme des instabilen Leukotrien A₄ aus Leukozyten auch von diesen Zellen produziert werden konnte (²²).

Die Vielzahl physiologischer Funktionen der Leukotriene als Immunmodulatoren in entzündlichen Prozessen umfasst unter anderem die Chemotaxis und Aktivierung von Leukozyten, die Steigerung der Gefäßpermeabilität, Vaso- und Bronchokonstriktion und die Modulation der Synthese weiterer Entzündungsmediatoren wie beispielsweise Interleukine (²⁰). Zur Ausübung dieser vielfältigen biologischen Wirkungen modulieren diese Eikosanoidderivate hierbei über spezifische, bei Entzündung vermehrt exprimierte, Membranrezeptoren mittels G-Protein-vermittelte Signalkaskaden die Funktion ihrer entsprechenden Zielzellen. Aufgrund der wiederholt nachgewiesenen Beteiligung von Eikosanoiden an pathologischen Prozessen ist deren Modulation die Grundlage zahlreicher Therapieansätze z.B. bei Asthma (²³), rheumatoider Arthritis (²⁴), kardiovaskulären Erkrankungen (²⁵) und Tumorleiden (²⁶). Als essentieller Bestandteil vieler therapeutischer Maßnahmen stellen die Gruppe antiinflammatorischer Medikamente wie Nicht-Steroidale-Antirheumatika und selektive Cyclooxygenase-2-Hemmer heutzutage die weltweit am meisten eingenommenen Arzneimittel dar (²⁷). Neben der Modulation von Leukotrienen in der Therapie von Entzündungen ist auch ein diagnostischer Einsatz dieser zentralen regulatorischen Einheiten von Inflammationen denkbar, derzeit jedoch nicht bekannt.

2.2 Molekulare Bildgebung

Momentan erfolgt der Nachweis ablaufender Entzündungsprozesse klinisch vor allem mittels labordiagnostischer Verfahren durch den Nachweis bestimmter Entzündungsparameter im

Blut. Die bei akuten inflammatorischen Vorgängen vermehrt produzierten Akute-Phase-Proteine wie das C-reaktive-Protein (CRP) sind jedoch oft nicht sensitiv genug ⁽²⁸⁾ und werden in Abhängigkeit des Krankheitsbildes sehr unterschiedlich exprimiert ⁽²⁹⁾, sodass sie beispielsweise für die Früherkennung bestimmter Krankheitsbilder wie der rheumatoiden Arthritis nicht zuverlässig sind ⁽³⁰⁾. Auch die klinische Standarduntersuchung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) stellt nur ein unspezifisches Suchverfahren bei Verdacht auf entzündliche Erkrankungen dar, welches sich aufgrund großer individueller Schwankungen und einer großen Anfälligkeit gegenüber Störfaktoren als vergleichsweise unsicher darstellt ⁽³¹⁾. Neben diesen allgemeinen Entzündungsparametern wird die serologische Diagnosestellung zunehmend durch die Erhebung charakteristischer Autoantikörperkonzentrationen wie Rheumafaktoren oder Anti-Neutrophilen-Zytoplasma-Antikörper (ANCA) im Blut unterstützt, welche jedoch ebenfalls nicht sehr sensitiv sind und oftmals erst spät im Krankheitsverlauf in Erscheinung treten ^(32, 33, 34).

Gemeinsam ist diesen in der Entzündungsdiagnostik zum Einsatz kommenden Laborbefunden, dass sie keinerlei Aussagen bezüglich der Lokalisation oder Ausdehnung des Entzündungsgebietes liefern. Im Gegensatz dazu können die konventionellen bildgebenden Verfahren wie Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) oder Sonographie anatomische und morphologische Strukturen sichtbar machen, ermöglichen in der Entzündungsdiagnostik jedoch nur die Darstellung des bereits pathophysiologisch veränderten Gewebes in einem Spätstadium der Entzündungsreaktion ⁽³⁰⁾. Ein frühzeitiges Erkennen dieser entzündlichen Krankheiten ist jedoch unabdingbar für die Einleitung schneller und zielgerichteter therapeutischer Maßnahmen, welche die Heilungschancen steigern bzw. zu einer relevanten Hemmung der Krankheitsprogression und der Entstehung irreversibler Gewebsschäden führen können.

Der Fortschritt im Bereich der molekularen Bildgebung in den vergangenen Jahren mit der Weiterentwicklung zahlreicher szintigraphischer und optischer Verfahren ermöglicht nun auch prinzipiell den Nachweis der initial ablaufenden molekularen Entzündungsprozesse auf DNA,- RNA,- oder Proteinebene. Dadurch wurde der Weg geebnet nicht invasiv biologische Prozesse und deren exakte Lokalisation auch *in vivo* darzustellen und z.T. zu quantifizieren. Das Prinzip der molekularen Bildgebung beruht hierbei auf der Markierung bestimmter Transportermoleküle wie Peptide, Antikörper sowie deren Fragmente mit signalgebenden Komponenten (siehe Abbildung 2.2).

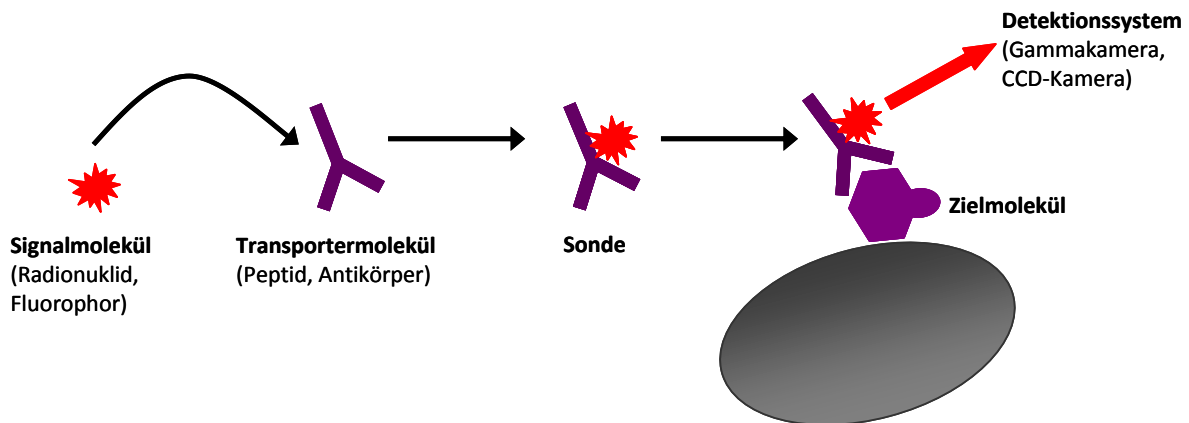


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Prinzips der molekularen Bildgebung. Die Sondenherstellung erfolgt hierbei durch die Kopplung von Signalmolekülen wie bspw. Fluorophoren und Radionukliden an dem Zielprotein entsprechend ausgewählten Transportermolekülen (Peptide, Antikörper). Ein auf die signalgebende Komponente abgestimmtes Detektionssystem (Gammakamera, CCD-Kamera, etc.) dient der indirekten Darstellung des Zielmoleküls auf molekularer Ebene.

Diese Sonde fungiert als molekulares Kontrastmittel, welches in Abhängigkeit des verwendeten Liganden unspezifisch, zielgerichtet oder aktivierbar sein kann ⁽³⁵⁾. Da die Darstellung der Zielstruktur mittels unspezifischer Kontrastmittel unter Ausnutzung der Permeabilitäts- und Perfusionsunterschiede zwischen den verschiedenen Geweben erzielt wird, eignet es sich lediglich zur Detektion später pathologischer Manifestationen. Im Gegensatz hierzu können zielgerichtete, durchgehend detektierbare Kontrastmittel sowie aktivierbare Kontrastmittel, welche nur unter Interaktion mit dem entsprechenden Targetmolekül ein Signal aussenden, auch zur Visualisierung früher pathologischer Prozesse eingesetzt werden ⁽³⁵⁾. Zur Auswahl des Transportermoleküls bei der Entwicklung der Sonden sollten weiterhin die hochaffine Bindungsfähigkeit, die Spezifität gegenüber der Zielstruktur sowie die Möglichkeit der Überwindung biologischer Barrieren *in vivo* (bspw. der Gefäßwand oder der Zellmembran bei intrazellulären Targets) auf dem Weg zur Zielstruktur garantiert sein. Weiterhin muss zur Darstellung der nachzuweisenden Struktur *in vivo* eine über einen gewissen Zeitraum ausreichend hohe Konzentration der Sonde im Zielgebiet gewährleistet werden ⁽³⁶⁾. Vor allem der Einsatz von Antikörpern als Liganden in diagnostischer sowie therapeutischer Anwendung ist seit der Zulassung des ersten Antikörper-basierenden Therapeutikums zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktion gegen Nierentransplantate 1986 stetig gestiegen ⁽³⁷⁾. So konnten 2010 bereits 15 klinisch eingesetzte Antikörper-basierende Therapeutika allein gegen inflammatorische Proteine z.B. gegen den Tumor-Nekrose-Faktor α verzeichnet werden. Weitere 9, beispielsweise zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis und Morbus Crohn, befinden sich in der finalen Phase der klinischen Erprobung ⁽³⁸⁾. Die Ursache der steigenden Popularität von Antikörpern

im Einsatz als Transportermolekül ist hierbei vor allem in ihrer hohen Affinität und Spezifität gegenüber dem Zielmolekül mit dem Ergebnis geringer Nebenwirkungen sowie der einfachen Kopplung an Signal- oder Wirkmoleküle begründet. Aufgrund der in den vergangenen Jahren bereits begonnen Weiterentwicklung und Kostenreduktion im Bereich des Syntheseprozesses sowie Verbesserungen der hergestellten Antikörper bezüglich ihrer Spezifität, Stabilität und Toxizität ist auch in Zukunft mit einer weiteren Optimierung der Antikörper als Liganden zur Diagnostik und Therapie z.B. im Rahmen von Tumorerkrankungen, Infektionen, Allergien und Entzündungsreaktionen zu rechnen (³⁹).

Die Transportermoleküle werden abhängig von der Detektionstechnik beispielsweise mit magnetischen, radioaktiven, fluoreszierenden oder biolumineszierenden signalgebenden Komponenten versehen. Zur Herstellung von Kontrastmitteln für die szintigraphische Bildgebung erfolgt die Markierung hierbei mit Radionukliden. Deswegen kommen bei der Detektion mit diesen Verfahren wie der Positron-Emissions-Computertomographie (PET) sowie der Single-Positron-Emissions-Computertomographie (SPECT) Gammakameras zum Einsatz. Mittels der PET- bzw. SPECT-Technik werden Entzündungen so bereits jetzt durch die Detektion der klinisch erprobten Radiopharmaka ¹⁸F-Fluordesoxyglukose (¹⁸F-FDG) sowie mittels ^{99m}Technetium (^{99m}Te)- oder ¹¹¹Indium (¹¹¹In)- markierten Leukozyten, welche allesamt unspezifische Marker für Inflammationsprozesse sind, dargestellt (⁴⁰). In neuesten Arbeiten von ⁴¹ gelang nun auch *in vitro* sowie *in vivo* erfolgreich die Darstellung von Entzündungsprozessen mit spezifischen, gegen das Zielmolekül COX-2 gerichteten ¹²³Iod (¹²³I)-markierten Celecoxib-Analoga. Trotz dieser Fortschritte sowie der Möglichkeit einer Gesamtkörperdarstellung, stellen die Belastung des Patienten durch den Einsatz der radioaktiven Isotope sowie vor allem die geringe Auflösung von 8-10 mm entscheidende Nachteile der szintigraphischen Bildgebung dar (⁴⁰).

Die optische Bildgebung erweist sich hingegen aufgrund der Ausnutzung von Fluoreszenz zur Darstellung der Zielmoleküle als ein im Vergleich zur Szintigraphie deutlich schonenderes, hochauflösendes und weniger zeitintensives Verfahren. Fluoreszenzphänomene entstehen wenn Moleküle Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und so auf ein höheres Energieniveau gelangen, von welchem sie jedoch praktisch augenblicklich wieder auf ihr Ausgangsniveau zurückfallen. Die zunächst aufgenommene Energie wird hierdurch wieder frei und als energieärmeres, d.h. langwelligeres Fluoreszenzlicht emittiert. Die Differenz der Wellenlängen des emittierten Fluoreszenzlichts gegenüber dem Anregungslicht von typischerweise 20-50 nm wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet und ermöglicht durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfilter die Unterscheidung von Anregungs- und Emissionslicht. Die sensitive Detektion des Lichts in der fluoreszenzoptischen Bildgebung

erfolgt mittels so genannter hochauflösender CCD- (engl. charged-coupled device) Kameras, welche in Mikroskopen sowie planaren und tomographischen Systemen eingesetzt werden (³⁵). Da momentan nur vereinzelt Geräte zur tomographischen optischen Bildgebung zur Verfügung stehen, werden derzeit vorrangig die auch als fluorescence reflectance imaging (FRI) bezeichneten, planaren Bildgebungssysteme verwendet. Diese sind vergleichbar mit der konventionellen Objektphotographie, da sie auf der Detektion, Verarbeitung und digitalen Aufzeichnung der von den Fluorochromen reflektierten bzw. emittierten Photonen auf Oberflächenstrukturen basieren (⁴²). Aufgrund der hohen Sensitivität, des geringen zeitlichen Aufwandes und der geringen Patientenbelastung erfolgen bereits zahlreiche klinische Anwendungen der FRI z.B. in laparoskopischer und endoskopischer Bildgebung. Durch den minimalinvasiven Einsatz fluoreszenz-bildgebender Endoskope gelang so beispielsweise erfolgreich der Nachweis fluoreszierender Escherichia coli-Bakterien in Entzündungsarealen (⁴³) sowie die Detektion von Tumoren im Gastrointestinaltrakt (⁴⁴). Durch die Kombination der auf anatomisch-morphologischer Ebene nur beschränkt aussagekräftigen optischen Bildgebung mit nuklearmedizinischen Verfahren wie CT und MRT z.B. durch ⁴⁵ konnte das Anwendungsgebiet der planaren Fluoreszenzbildgebung zusätzlich erweitert werden. Auch der gleichzeitige Einsatz mehrerer Fluorophore zur Darstellung mehrerer Zielstrukturen im Rahmen eines multifaktoriellen Ansatzes, zeichnet die optische Bildgebung gegenüber den anderen diagnostischen Verfahren aus und wird zunehmend öfter beschrieben (⁴⁶).

Limitiert wird die FRI jedoch durch ablaufende Reflexionsprozesse an glatten Oberflächen ebenso wie durch die mit wenigen Zentimetern sehr begrenzte Eindringtiefe in das Gewebe. Die Einschränkung der Penetrationstiefe beruht vor allem auf Interaktionen des zur Anregung der Probe verwendeten Lichts mit Gewebsstrukturen wie Zellmembranen oder -organellen, welche jedoch in Abhängigkeit der Lichtwellenlänge unterschiedlich ausgeprägt sind (⁴²) (siehe Abbildung 2.3). Im sichtbaren Wellenlängenbereich von 450 bis 600 nm zeigen beispielsweise biologische Chromophore wie Hämoglobin und Myoglobin eine starke Autofluoreszenz, während Wasser und Lipide vorrangig infrarotes Licht absorbieren (⁴⁷). Licht im Nah-Infraroten-Bereich zwischen 650 und 900 nm erreicht somit aufgrund der insgesamt geringen Wechselwirkung der Photonen mit dem Gewebe zum einen die maximale Eindringtiefe von wenigen Zentimetern, sowie eine durch geringe Lichtstreuung bedingte hohe Auflösung zur optimalen Lokalisierung, weswegen dieser Wellenlängenbereich auch als „diagnostisches Fenster“ bezeichnet wird (⁴²).

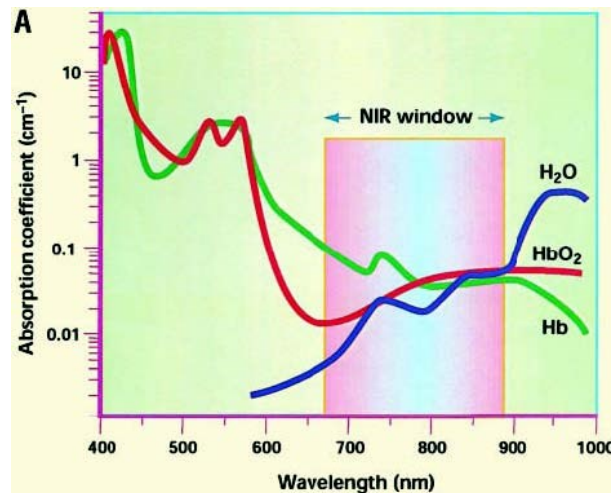


Abbildung 2.3: „Diagnostisches Fenster“ in der optischen Bildgebung. Die Absorption der biologischen Moleküle Wasser (H_2O) Hämoglobin (Hb) und oxygeniertes Hämoglobin (HbO_2) wird in Abhängigkeit der Wellenlänge des Lichts dargestellt. Abbildung entnommen aus ⁴⁸.

Aufgrund dieser Vorteile des Nah-Infraroten Lichts werden für die optische Bildgebung bevorzugt NIR-Fluorophore eingesetzt, welche sich in biologischen Systemen außerdem durch einen guten Kontrast des Fluorophor-Signals gegenüber dem Signal des Hintergrundgewebes auszeichnen (⁴²). Als Fluorophore werden derzeit meist kleine organische Farbstoffmoleküle, Quantum Dots und autofluoreszierende Proteine wie das Grüne fluoreszierende Protein (GFP) verwendet (⁴⁹), wobei diese für den Einsatz als optische Kontrastmittel einige wesentliche Voraussetzung erfüllen müssen: Unabdingbar sind die Stabilität der Fluorophore in dem biologisch relevanten pH-Bereich von 4,7 bis 7,4, hohe Quantenausbeuten für eine effiziente Fluoreszenzemission, eine gute Wasserlöslichkeit sowie der Ausschluss toxischer oder photosensibilisierender Wirkungen (⁴²). Eine weitere wichtige Anforderung an Fluorophore ist die möglichst hohe Photostabilität, welche unter anderem einen Nachweis mit ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) ermöglicht. Zusätzlich werden Fluorophore durch photochemische Zerstörungsprozesse (engl. Photobleaching) irreversibel in nichtfluoreszierende Moleküle umgewandelt, wobei auch toxische Radikale entstehen können (⁵⁰).

Von den in optischen Kontrastmitteln vorwiegend verwendeten kleinen organischen Farbstoffmolekülen haben sich vor allem die Cyanine (Cy) als günstig erwiesen. Das wohl bekannteste unter ihnen ist das symmetrische Indocyaningrün (ICG), welches neben Methylblau und Fluoresceinisothiocyanat (FITC) als einziges Fluorophor klinisch erprobt ist und in der ophthalmologischen Fluoreszenzangiografie der Choroidea sowie zu Funktionsuntersuchungen in der Hepatologie sowie der Kardiologie zum Einsatz kommt (⁴²). Seit der klinischen Einführung des Rheumascans der Mivenion GmbH (Berlin) im April 2009 ist nun auch erstmals die optische Bildgebung von Inflammationen im Rahmen rheumatoider

Arthritis der Handgelenke möglich (⁵¹). Die Darstellung der Entzündungsprozesse in oberflächlichen Geweben basiert hierbei auf einer unspezifischen Anreicherung von ICG in den Bereichen der entzündungsbedingt gestörten Mikrozirkulation und wird mittels des Fluoreszenzkamerasystems Xiralite® detektiert (⁵²)

Auch in der Entwicklung spezifischer optischer Kontrastmittel zur Darstellung von Entzündungsprozessen wurden bereits weitere, dem ICG strukturell verwandte, Cyanine genutzt. So erfolgte beispielsweise durch ⁵³ sowie ⁵⁴ mittels Cy5.5-gekoppelter-Antikörper gegen die Entzündungsrezeptoren CD31 bzw. CD40 erfolgreich eine Darstellung von Inflammationen *in vivo*. Nachteile aller symmetrischen Cyanine wie ICG und Cy5.5 sind jedoch ihre geringe Quantenausbeute und Wasserlöslichkeit, vermehrte unspezifische Plasmaproteinbindungen sowie der Mangel an chemischen Kopplungsgruppen (⁵⁵). Die asymmetrischen NIR-Cyanin-Farbstoffe der Firma Dyomics sind hingegen mehrheitlich gut wasserlöslich und zeichnen sich gegenüber dem ICG durch eine geringe Zytotoxizität und eine bessere Stabilität sowie Kopplungsfähigkeit aus, weswegen sie möglicherweise auch in der klinischen Anwendung an Bedeutung gewinnen können (⁵⁶). Die erfolgreiche Herstellung von NIR-Sonden mit Fluorophoren der Firma Dyomics gelang beispielsweise bereits für molekulare Zielstrukturen des Leukotrienstoffwechsels wie den Leukotrienrezeptoren CysLT1 *in vivo* (⁵⁷) sowie BLT1 *in vitro* (⁵⁸), welche perspektivisch als Bestandteile eines multifaktoriellen Kontrastmittelsystems zur Detektion von Entzündungen zum Einsatz kommen könnten. Während diese bereits erfolgreich hergestellten NIR-Sonden durch eine zielgerichtete, spezifische Kontrastmittelanreicherung jedoch lediglich die Expression der einzelnen Targets nachweisen, könnte die Darstellung von Protein-Protein-Interaktionen neben einer Steigerung der SNR auch weitere Aufschlüsse über den ablaufenden Entzündungsprozess erbringen. Unter Ausnutzung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) können auch mittels optischer Bildgebung Aussagen hinsichtlich der Aktivität und Wechselwirkungen von Proteinen generiert werden und eine exakte, dynamische Darstellung eines akuten Entzündungsgeschehen *in vivo* ist möglich.

2.3 Darstellung von Protein-Protein-Interaktionen mittels FRET

Zur Entwicklung eines Nachweises von Protein-Protein-Interaktionen mittels optischer Bildgebung unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen als signalgebende Moleküle ist die Analyse der Wechselwirkungen dieser Fluorophore untereinander essentiell.

Infolge von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen beispielsweise im Rahmen einer Kollision zweier Fluorophore besteht die Möglichkeit eines strahlungslosen Energietransfers zwischen diesen

Molekülen, welcher auch als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet wird. Dieser quantenmechanische Prozess, bei dem es zu einer Energieübertragung von einem Donor- auf ein Akzeptorfluorophor kommt, wurde erstmals durch Theodor Förster 1948 quantitativ beschrieben ⁽⁵⁹⁾. Voraussetzung eines solchen Energietransfers ist eine hinreichende Überlappung des Absorptionsspektrums vom Akzeptorfluorophor mit dem Emissionsspektrum des beteiligten Donorfluorophors sowie deren annähernd parallele Dipol-Orientierung. Weiterhin ist für das Zustandekommen eines solchen FRET-Effekts die enge räumliche Nähe beider Farbstoffe unabdingbar, üblicherweise ist ein Abstand der Moleküle im Bereich von etwa 0,5 bis 10 nm erforderlich ⁽⁶⁰⁾. Die Effizienz dieses Prozesses ist invers zur 6. Potenz des Molekülabstandes, wobei die Distanz bei welcher der Energietransfer eine Effizienz von etwa 50 % erreicht, auch als Förster-Radius R_0 bezeichnet wird ⁽⁵⁹⁾. Das mittels FRET-Effekt in einen angeregten Zustand versetzte Akzeptorfluorophor kann beim Rückfall auf sein ursprüngliches Niveau die zugeführte Energie zum einen ebenfalls in strahlungsloser Form an das ehemalige Donorfluorophor abgeben und somit eine gegenseitige Fluoreszenzauslöschung bewirken ⁽⁴²⁾. Häufiger wird die auf den Akzeptorfarbstoff übertragene Energie allerdings durch Photonen in Form von detektierbarer Strahlung abgegeben. Dies stellt die Grundlage der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen auf molekularer Ebene basierend auf den Wechselwirkungen fluoreszierender Moleküle dar (siehe Abbildung 2.4).

Neben und konkurrierend zum für den Nachweis der Interaktion genutzten Energietransfer zwischen den Fluorophoren können jedoch weitere Prozesse auftreten. So kann die enge räumliche Nähe zweier Fluorophore beispielsweise durch den Einsatz zu hoher Farbstoffkonzentrationen zur Entstehung von Fluorophorkomplexen führen. Die Konsequenz dieser Komplexe ist eine Verschiebung des Absorptionsspektrums in kurzwelligere (H-Dimere) oder langwelligere Bereiche (J-Dimere), welche mit einer vollständigen, für die optische Bildgebung als störend empfundene Fluoreszenzsignalauslöschung (*engl.* Quenching), verbunden ist und auch als Self-Quenching bezeichnet wird ⁽⁶¹⁾. Die Vermeidung der Fluoreszenzsignalauslöschung als Konkurrenzprozess zum FRET-Effekt ist daher ein wesentlicher Aspekt in der Herstellung eines Kontrastmittels zur optischen Darstellung von Protein-Protein-Interaktionen.

Zur Entwicklung eines solchen optischen Kontrastmittels erfolgt zunächst die Auswahl eines auf Grundlage der oben genannten Kriterien für den FRET-Effekt prinzipiell geeigneten Farbstoff-Paares. Diese selektierten Fluorophore werden anschließend an Antikörper gekoppelt, welche gegen die zu untersuchenden Proteine gerichtet sind. Ziel ist dabei die Bindungsstellen so zu wählen, dass es im Falle von Interaktionen bzw. einer Veränderung der

Orientierung oder Konformation des Targetmoleküls zur räumlichen Nähe der Antikörper-gebundenen Farbstoffmoleküle kommt (siehe Abbildung 2.4). Die nachfolgende Anregung des Donorfluorophors führt aufgrund des Energietransfers im Rahmen eines FRET-Effekts zur Abnahme der Donoremission bei gleichzeitiger Zunahme der Akzeptoremission. Der Nachweis einer Reduktion der Donorfluoreszenzintensität bei gleichzeitigem Anstieg des Akzeptorfluorophorsignals dient somit als Kriterium eines stattgefundenen FRET-Effekts und ermöglicht entsprechend der gewählten Antikörperbindungsstellen Aussagen bezüglich Protein-Protein-Wechselwirkung bzw. der Konformationsänderungen eines einzelnen Target-Proteins.

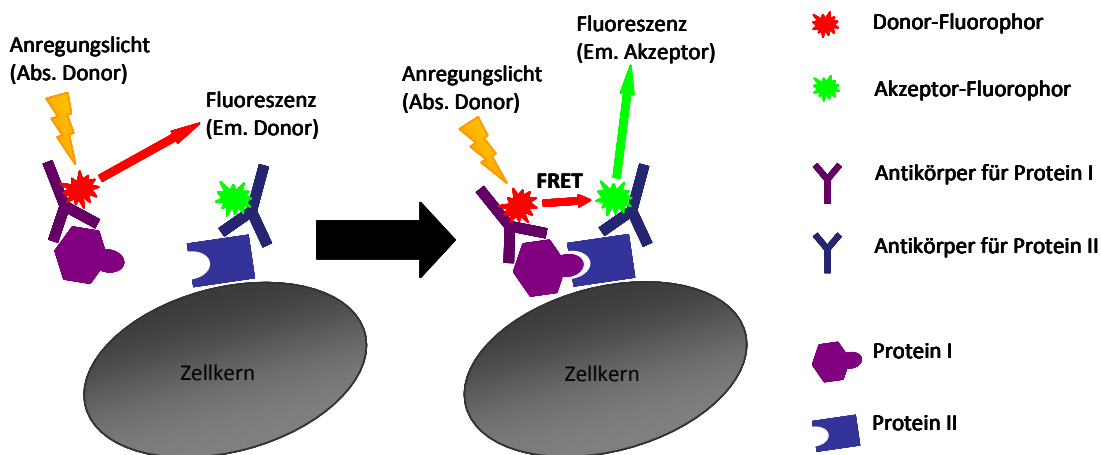


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Nachweises von Protein-Interaktionen mittels FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) am Beispiel eines Sondensystems aus fluoreszierenden signalgebenden Komponenten und Antikörpern als Transportermolekülen. Bei starker Entfernung der Zielmoleküle (Protein I und Protein II) führt die Bestrahlung des Donor-Farbstoffes mit Licht der entsprechenden Wellenlänge (Absorption Donor) zur kurzzeitigen Anregung des Fluorophors und nachfolgender Abgabe der Energie in Form von Fluoreszenz (Emission Donor). Erst die Interaktion der Zielproteine I und II bewirkt eine ausreichende räumliche Nähe der Sonden als Voraussetzung für einen Energietransfer zwischen den Fluorophoren. Der Donor kann nun bei erneuter Anregung (Absorption Donor) Energie auf den Akzeptor übertragen, welcher diese wiederum in Form von Fluoreszenz abgeben kann. Dieses emittierte Licht entspricht nun jedoch der Fluoreszenzwellenlänge des Akzeptorfluorophors (Emission Akzeptor) und kann daher vom Detektionssystem isoliert nachgewiesen werden.

Das Prinzip der molekularen Darstellung von Protein-Interaktionen mittels FRET bei inflammatorischen Prozessen wurde bereits erfolgreich beispielsweise von ⁶², ⁶³ sowie von ⁶⁴ angewandt. ⁶² konnte hierbei schon 1995 unter Ausnutzung des FRET-Effekts der Antikörpergekoppelten Fluorophore Fluoresceinisothiocyanate (FITC) und Cy3 *in vitro* den Zusammenhang zwischen der Interleukin 1-Konzentration und der Dichte ihrer Rezeptoren aufgrund anhand von Wechselwirkungen zwischen diesen Proteinen bei ablaufender Immunreaktion nachweisen. 2006 gelang auch der Arbeitsgruppe von R. G. Sitrin mittels FRET die Erweiterung des Wissenstandes bezüglich der molekularen Abläufe bei

Entzündungen (⁶⁴). Sie konnten durch den Energietransfer zwischen den an Antikörpern gebundenen FITC- bzw. Tetramethylrhodamine-Isothiocyanate-Fluorophoren *in vitro* die Rolle des Lipid Rafts Flottilin-1 in der Leukotrien A₄-vermittelten Signalkaskade neutrophiler Granulozyten ermitteln. ⁶³ nutzte hingegen zur *in vitro* Untersuchung der Rolle der Matrixmetalloproteinase 12 in Entzündungsprozessen das gegenseitige Quenching zweier Farbstoffmoleküle bei enger räumlicher Nähe, welches erst infolge von Konformationsänderungen im Rahmen proteolytischer Spaltungen aufgehoben wurde. Die in diesen beschriebenen Arbeiten verwendeten Farbstoffe gehören allesamt nicht zur Gruppe der NIR-Fluorophore und sind daher aufgrund der in Abschnitt 2.2 beschriebenen Nachteile von Messungen im sichtbaren und infraroten Licht nur begrenzt zu FRET-Darstellungen *in vivo* geeignet.

Eine Detektion von Entzündungsherden mittels molekularer, optischer Bildgebung durch den Einsatz von NIR-FRET-Sonden zur Darstellung von intrazellulären Protein-Protein-Interaktionen ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

3 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von Sonden aus FRET-geeigneten-DY-Fluorophor-Paaren und Antikörpern gegen Protein-Targets, welche Bestandteile der zellulären Signalkaskade zur Entstehung von Entzündungsmediatoren sind. Diese FRET-Sonden sollen als Bestandteile eines multifaktoriellen Kontrastmittels durch die optische Darstellung der Interaktion zwischen der 5-Lipoxygenase (5-LO) und dem 5-Lipoxygenase-aktivierendem Protein (FLAP) das Vorhandensein einer akuten Inflammationsreaktion nachweisen. Damit soll eine Basis geschaffen werden zur nicht invasiven, schnellen Detektion und exakten Lokalisation der initial ablaufenden molekularen Entzündungsprozesse, welche zukünftig eine frühzeitige Diagnose und Therapie vor allem von degenerativ-entzündlich Erkrankungen ermöglicht. Dazu soll nach folgendem Plan vorgegangen werden:

Zunächst soll das NIR-Fluorophor-Paar DY-682/DY-782 als positives FRET-Paar und DY-505/DY-782 als negatives FRET-Paar (Kontroll-Paar) auf Grundlage der in Abschnitt 2.3 aufgeführten Kriterien bestätigt werden, da in dieser Arbeit durch Nachweis des FRET-Effekts unter Ausnutzung der räumlichen Nähe zweier Proteine, Aussagen bezüglich ihrer Aktivität und Wechselwirkungen gewonnen werden sollen. Die nachfolgende Herstellung der Modell-Sonden durch Kopplung der Fluorophore an rabbit-serum-Immunglobuline (IgG) soll neben der Optimierung einzelner Parameter der Sondenherstellung vor allem der Charakterisierung der Sonden hinsichtlich ihres molaren Detektionslimits, ihrer Stabilität sowie Spezifität dienen, wobei die dabei gewonnenen Ergebnisse auf die Arbeit mit den später verwendeten spezifischen IgG's übertragen werden sollen. Hierbei soll bei der Herstellung der Sonden zunächst das optimale Kopplungsverhältnis zwischen IgG und Fluorophor mit maximaler Sondenfluoreszenz durch Reduktion von Fluoreszenzauslöschungsphänomenen zwischen den Fluorophormolekülen (= Quenchingeffekt, siehe Abschnitt 2.3) festgestellt werden. Zur Ermittlung eines hinsichtlich der absoluten Materialverluste des Antikörpers sowie der Aufkonzentrierung der finalen Sondenlösung optimalen Aufreinigungsverfahrens der Modell-Sonden sollen anschließend die auf dem Prinzip des Größenausschlusses basierenden Techniken der Chromatografie und der Ultrafiltration verglichen werden. Die nachfolgende Bestimmung des molaren Detektionslimits, also die für eine erfolgreiche Detektion mittels des Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Imagers minimal pro Spot aufzutragende Fluorophorstoffmenge der auf Membranen fixierten Fluorophorlösung, soll mit Hilfe einer Konzentrationsreihe erfolgen und dient der Generation Signal-intensiver Aufnahmen der Fluorophore. Die Analyse der

Stabilität der Modell-Sonden durch spektrophotometrische Bestimmung der mittleren Anzahl pro Antikörper gebundener Fluorophore (Dye-Protein-Ratio) soll über einen Zeitraum von 8 Wochen erfolgen, um möglicherweise eine Haltbarkeitsgrenze der gekoppelten Sonden für alle folgenden Versuche festzulegen. Weiterhin sollen zum Nachweis der Bindungsfähigkeit der hergestellten Modell-Sonden diese mittels Dot Blot-Technik untersucht werden, wobei durch das direkte Auftragen der Antigenproben (IgG) und der anschließenden Inkubation mit den Modellsonden die Spezifität der Antikörper-Antigen-Bindung analysiert werden soll.

In einem nächsten Schritt erfolgt die Herstellung spezifischer FLAP- bzw. 5-LO-Sonden aus den DY-505-, DY-682- und DY-782-Fluorophoren sowie Anti-human-5-LO- bzw. Anti-human-FLAP-IgG. Auch diese Sonden werden bezüglich ihrer Fluoreszenzintensität durch Vergleich der Signalstärken mit fluorophormengen-äquivalenten Farbstofflösungen im Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Imager analysiert, um ihre Detektion in späteren *in vitro* Versuchen zu gewährleisten. Anschließend sollen die spezifische FLAP- bzw. 5-LO-Sonden hinsichtlich eines Energietransfers zwischen den Fluorophoren zum Nachweis des FRET-Effekts auch in Anwesenheit von IgG-Molekülen untersucht werden. Die nachfolgenden Dot-Blot-Versuche sollen die Bindungsfähigkeit der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden an ihre entsprechenden Protein-Targets 5-LO bzw. FLAP bestätigen, welche Grundlage der Darstellung der Protein-Protein-Interaktionen in Zellen ist.

Für die spätere mikroskopische Analyse der intrazellulären Lokalisation der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden *in vitro* soll ein geeignetes Zellmodell entwickelt werden. Hierzu werden zunächst humane eosinophile Granulozyten (HL-60eos-Zellen) sowie humane Fibroblasten (BJ-Zellen) auf die Expression von 5-LO und FLAP untersucht um eine Positiv- und eine Negativzelllinie zu ermitteln. Der Nachweis soll sowohl auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time-PCR und anschließend auch auf Proteinebene mittels SDS-Page mit nachfolgendem Western Blot sowie mittels Durchflusszytometrie erfolgen.

Zur *in vitro* Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden in HL-60eos- sowie BJ-Zellen werden diese nach Fixierung und Permeabilisierung mit den entsprechenden Sonden inkubiert. Durch anschließende lichtmikroskopische Darstellung der behandelten Zellen sollen Aussagen bezüglich der genauen Lokalisation der Sonden und somit auch der Proteine 5-LO und FLAP in den Zellen gewonnen werden. Die mikroskopische Detektion der intrazellulär lokalisierten Sonden soll zudem einer ersten Analyse der Nachweisbarkeit des FRET-Effekts *in vitro* dienen, um eine Interaktion von 5-LO und FLAP zu detektieren.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

In der Tabelle 4.1 sind alle für die Versuche verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 4.1 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte mit Angabe der Hersteller und des Firmensitzes

Geräte	Hersteller
Accu-Jet®	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Dtl.
Agarose-Elektrophoresekammer und Zubehör	BioRad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Aufrechtes Fluoreszenzmikroskop	<i>Axioplan 2 Imaging</i> , Carl Zeiss Mikrolmaging GmbH, Dtl.
Brutschrank HeraCell	<i>Heraeus</i> , Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Durchflusszytometer (FACS)	<i>FACSCalibur™</i> , BD Biosciences, Heidelberg, Dtl.
Eismaschine	<i>Ziegra</i> , Dresdner Kühlanlagenbau, Dresden, Dtl.
Elektrophorese Stromversorgung	<i>PowerPac™</i> , BioRad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Elektroblotter Stromversorgung	<i>Consort E844</i> , Consort nv, Turnhout, Belgien
Feinwaage	<i>Isocal AC 211P</i> , Sartorius AG, Göttingen, Dtl.
Gas-Sicherheitsbrenner	<i>Schuett Phoenix</i> (Schuett Biotec), Göttingen, Dtl.
Gefrierschrank (-80°C)	<i>ULT Freezer Thermor forma</i> , Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Dtl.
Geltrockner	<i>SGD 5040</i> , Savant Instruments Inc., New York, USA
Lumineszenz Viewer	<i>LAS-3000</i> , Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Dtl.
Maestro™	CRi Inc., Woburn Massachusetts, USA
Magnetrührer (beheizbar)	<i>IKA® RH digital KT/C</i> , IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Dtl.
Mikroplattenreader	<i>Tecan Sunrise Basic</i> , Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Dtl.
Mikrowelle	<i>MW1243 CB</i> , Bomann, Kempen, Dtl.
NanoDrop™	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
PAGE-Kammer und Zubehör	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Dtl.
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Schweiz
Pipetten	<i>Reference</i> , Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
	<i>Nichipet EX</i> , Nichiryo/Novodirect GmbH, Kehl/Rhein, Dtl.
	<i>Transferpette S</i> , Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Dtl.
Phasenkontrastmikroskop	<i>CK 40</i> , Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Dtl.
Real-Time-PCR-Maschine	<i>Rotor-Gene Q®</i> , Qiagen GmbH, Hilden, Dtl.

Fortsetzung Tabelle 4.1

Schüttelinkubator	<i>GFL-3031</i> , Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Dtl.
Semi-Dry-Elektroblotter	<i>PerfectBlue™</i> , Modell <i>SEDEC M</i> , PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Dtl.
Spektrophotometer	<i>Ultrospec 3300 pro</i> , Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Taumelmischer	<i>Heidolph Polymax 2040</i> , Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Dtl.
Thermocycler	<i>peqSTAR 96 Univesal Gradient</i> , PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Dtl.
Thermomixer	<i>Thermomixer Comfort</i> , Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
Ultraschallbad	<i>Sonorex RK52H</i> , Bandelin, Berlin, Dtl.
UV-Imager	<i>Image Master® VDS</i> , Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Dtl.
Vakuumpumpe	HLC Biotech, Bovenden, Dtl.
	<i>Gel Pump G110</i> , Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Dtl.
Vortexer	<i>Vortex-Genie 2</i> , Scientific Industries Inc., New York, USA
Werkbank	<i>Hera safe</i> , Fisher Scientific GmbH, Schwerte
	<i>Holten LaminAir</i> , Thermo Scientific, Waltham (MA), USA
Zellzähler CASY®	<i>Model DT</i> , Innovatis AG, Bielefeld, Dtl.
Zentrifuge	<i>Biofuge primo</i> , Thermo scientific, Bonn, Dtl.
	<i>Centrifuge 5417R</i> , Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
	<i>Centrifuge 5424</i> , Schuett24 GmbH, Göttingen, Dtl.
	<i>Heraeus Primo R Benchtop</i> , Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Dtl.
	<i>Rotilabo®-Mini-Zentrifuge</i> , Carl Roth, Karlsruhe, Dtl.
	<i>Universal 320R</i> , A. Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Dtl.

4.1.2 Verbrauchs- und sonstige Materialien

In der Tabelle 4.2 sind alle für die Versuche verwendeten Materialien aufgeführt.

Tabelle 4.2 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Materialien mit Angabe der Hersteller und des Firmensitzes

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-Well-Platten	<i>96 Well Polystyrol Microplatte, transparent</i> , Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Dtl.
Alufolie	Fora GmbH, Radolfzell, Dtl.
Bechergläser	VWR International GmbH, Darmstadt, Dtl.
Centrifugal Filter Units (0,5 ml; 10 K)	Amicon® Ultra, Millipore Corporation, Schwalbach, Dtl.
Eppendorf Safe Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
Erlenmeyerkolben	Fisherbrand – Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Dtl.

Fortsetzung Tabelle 4.2

FACS-Röhrchen (5 ml)	<i>Polystyrene Round-Bottom Tube</i> , BD Biosciences, Heidelberg, Dtl.
Falcontubes (15 und 50 ml)	<i>Cell star</i> , Greiner, Solingen, Dtl.
Axioplan 2 Filtersätze	Carl Zeiss MicroImaging GmbH; Jena, Dtl.
	Chroma Technology Corporation, Bellows Falls, USA
Filterpapier Ø 150 mm	Macherey Nagel GmbH & Co., Düren, Dtl.
Gel-Blotting-Papier	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Gelfärbeschalen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Glasflaschen (50 – 1000 ml)	Schott AG, Mainz, Dtl.
Glassmesspipetten 2 ml	<i>Schellbach, Klasse A5, Hirschmann</i> , VWR International GmbH, Darmstadt, Dtl.
Glaswolle	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Handschuhe	<i>Sensi Clean, Latex</i> , Ansell Lalaysia Sdn Bhd, Melaka, Malaysia
	<i>Aloetouch 12" Nitrile</i> , Medline Industries Inc., USA
Latex-Beads (Ø 4 µm)	Invitrogen, Californien, USA
Maestro™ Filter	CRI Inc., Woburn Massachusetts, USA
Messbecher	Fisherbrand – Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Dtl.
Messzylinder	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Dtl.
Nitrocellulosemembran	<i>Hybond-C-Extra</i> , Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA
Pasteurpipette	Assistant-Präzision Karl Hecht, Sondheim, Dtl.
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen, Dtl.
	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Dtl.
Pipettenspitzen mit Filter	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen, Dtl.
Präzisionsküvetten aus Quarz	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Dtl.
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark-Professional, Kimtech Science, UK
Protein LowBind Tubes (1,5 - 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
PVDF-Membran	Roche, Mannheim, Dtl.
Qiagen-Cups (200 µl)	Qiagen GmbH, Hilden, Dtl.
Rührfisch	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Spritze (10 ml)	Braun Melsungen AG, Melsungen, Dtl.
Ständer für Sephadex-Säule	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Sterilfilter (0,2 µm)	<i>Syringe Filter</i> , Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Dtl.
Trichter	VWR International GmbH, Darmstadt, Dtl.
Zellkulturflaschen	<i>Cellstar®</i> , Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Dtl.

4.1.3 Chemikalien

In der Tabelle 4.3 sind alle für die Versuche verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 4.3 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien mit Angabe der Hersteller und des Firmensitzes

Substanz	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid	<i>Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1)</i> , Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Agarose	<i>Agarose NEEO Ultra-Qualität</i> , Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Amidoschwarz 10B	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Ammoniumperoxidsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Aqua bidest.	Millipore Corporation, Schwalbach, Dtl.
Bovines serum albumin (5 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Bromphenol-Blau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Dtl.
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, München, Dtl.
Chemiluminescent HRP Substrat	<i>Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate</i> , Millipore Corporation, Schwalbach, Dtl.
Coomassie Brilliantblau R-250	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
DEPC-H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Dimethylformamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg #20270, Dtl.
Dimethylsulfoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich GmbH, München, Dtl.
Dithiothreitol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
DNA-Leiter 50 bp	JenaBioscience GmbH, Jena, Dtl.
Dulbecco's Modified Eagle Medium	F12 <i>Gibco</i> ®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Ethanol	Ethanol absolut (99 %) Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.
Ethidiumbromid	Invitrogen, Californien, USA
Ethylendiamintetraacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Fetales Kälberserum	<i>Gibco</i> ®, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Hank's Balanced Salt Solution	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Hoechst-Kernfarbstoff	AppliChem GmbH, Darmstadt, Dtl.
IMDM	<i>Gibco</i> ®, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.

Fortsetzung Tabelle 4.3

Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
MEM	<i>Gibco</i> [®] , Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
B-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Milchpulver	Gabler Saliter GmbH, Obergünzburg, Dtl.
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Natriumdesoxycholat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
PCR-Mastermix	<i>RotorGene</i> [®] , Qiagen GmbH, Hilden, Dtl.
	<i>QuantiTect</i> [®] , Qiagen GmbH, Hilden, Dtl.
Permafluor (Mountant)	Thermo Fisher Scientific, Astmoor, UK.
Phosphorsäure 85 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Poly-L-Lysin (0,01 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Ponceau S Solution (0,2 % Ponceau in 3 % TCA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Dtl.
Protease Inhibitor (Einzelkomponenten n.b.)	<i>Complete mini</i> , EDTA-frei, Roche, Mannheim, Dtl.
Orange G	Genaxxon BioScience GmbH, Ulm, Dtl.
Proteinleiter	<i>Page Ruler</i> [™] , Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Dtl.
QuantiPro BCA Assay („Lösung A“, „Lösung B“, „Lösung C“)	<i>QuantiPro BCA Assay Kit</i> Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Reverse transcription kit	<i>QuantiTect</i> [®] <i>Reverse transcription kit</i> , Qiagen GmbH, Hilden, Dtl.
RNA Isolations Kit	<i>High Pure RNA Isolation Kit</i> , Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Dtl.
Roti [®] -Block (10 x)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Salzsäure (37 %ig)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Sephadex G-25 Medium	Amersham Biosciences, Uppsala , Schweden
Sodium-Dodecyl-Sulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Triton [®] X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Trizol [®] -Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Tween 20 [®]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.

4.1.4 Puffer, Lösungen und Medien

In der Tabelle 4.4 sind alle für die Versuche verwendeten Puffer, Lösungen und Medien aufgeführt.

Tabelle 4.4 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
Amidoschwarzlösung	0,1 % (w/v) Amidoschwarz in 7 % (v/v) Essigsäure
Blockpuffer I	10 x Roti®-Block 1 : 10 in Waschpuffer
Blockpuffer II	5 % (v/v) BSA in Waschpuffer
Blockpuffer III	2 % (v/v) BSA in HBSS
Coomassie-Färbelösung	0,6 mol/L Coomassie Brilliant Blue R-250 12,3 mol/L Methanol 1,75 mol/L Essigsäure
Coupling Buffer	100 mmol/L NaHCO ₃ 500 mmol/L NaCl pH-Wert 8-9
Einfriermedium	Kulturmedium mit 8 % (v/v) DMSO
Entfärbelösung	2,5 mol/L Methanol 1,75 mol/L Essigsäure in A. dest.
FACS-Puffer	1 % (w/v) BSA 0,2 % (v/v) Tween 20® in PBS
Fixierlösung	30 % Triton® X-100 in A. dest. 15 % (v/v) Formaldehyd in HBSS
Lysepuffer nach Vellonen et al.	1 %, (v/v) Triton® X-100 20 mmol/l Tris-HCl 150 mmol/l NaCl pH 6,8
PBS	3 mmol/L KCl 0,137 mol/L NaCl 1,5 mmol/L KH ₂ PO ₄ 8,0 mmol/L Na ₂ HPO ₄
Poly-L-Lysin-Gebrauchslösung	0,01 % (v/v) Poly-L-Lysin 1 : 10 in A. dest.
Protease-Inhibitor-Lösung	1 Tablette <i>Complete mini</i> - Protease Inhibitor in 1,5 µl A.dest.

Fortsetzung Tabelle 4.4

RIPA-Ansatz	50 mmol/L Tris HCl pH 6,8 150 mmol/L NaCl 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat 1 %, (v/v) Triton-X® 100 0,1 % (w/v) SDS pH 8,0
SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer	2,5 mmol/L Tris 0,192 mol/L Glycin 5 % (w/v) SDS pH 8,8
SDS-PAGE-Ladepuffer	125 mmol/L Tris HCl pH 6,8 30 % (v/v) Glycerin 10 % (w/v) SDS 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,125 M Tris pH 6.8
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	0,375 M Tris pH 8.8
Stimulationslösung	10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) DMSO in IMDM
TAE-Puffer	40 mmol/L Tris-Base 20 mmol/L Eisessig 1 mmol/L EDTA pH 8.0
Transferpuffer Ansatz	24,8 mmol/L Tris-Base 192 mmol/L Glycin 4,9 mol/L Methanol pH 8,3
Verdünnungspuffer I	10 x Roti®-Block 1 : 100 in Wasser
Verdünnungspuffer II	0,5 % (v/v) BSA in Waschpuffer
Waschpuffer	0,1 % (v/v) Tween 20® in PBS

4.1.5 Software

In der Tabelle 4.5 ist die in dieser Arbeit verwendete Software aufgeführt.

Tabelle 4.5: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Software mit Angabe deren Hersteller und Firmensitz.

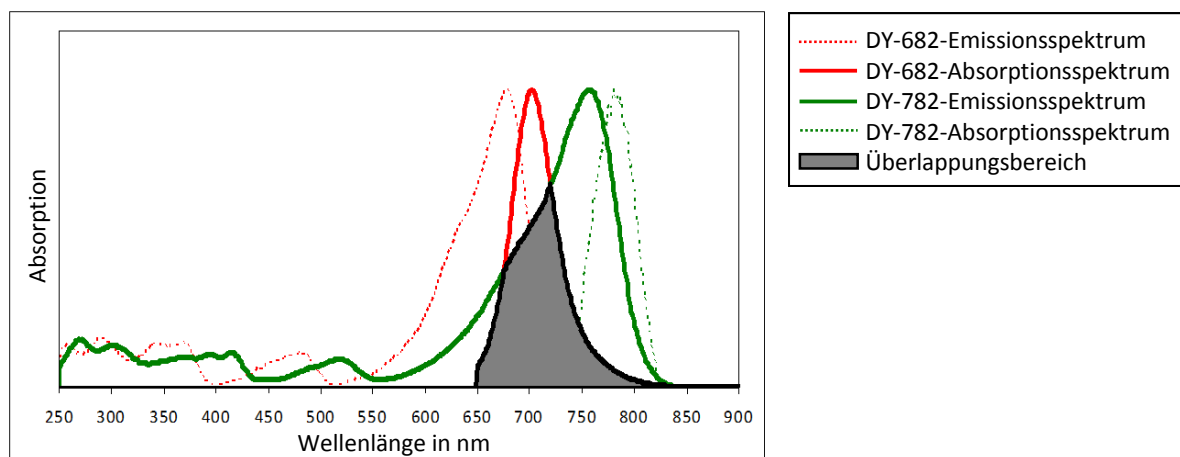
Software	Hersteller
AxioVision 4.6	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Dtl.
Bildverarbeitungssoftware ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/
Cell Quest Software	BD Biosciences, Heidelberg, Dtl.
Genevestigator V3	Nebion AG, Zürich, Schweiz
Maestro TM Software	2.10.0, CRi Inc., Woburn, USA
Microsoft Office 2003/2010	Microsoft Dtl. GmbH, Unterschleißheim, Dtl.
Multi Gauge	Fujifilm, Düsseldorf, Dtl.
Tecan Sunrise Basic Software	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Dtl.
Rotor-Gene [®] Q Series-Auswertungssoftware	Qiagen, Hilden, Dtl.

4.1.6 Fluoreszenzfarbstoffe

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe der Firma Dyomics GmbH (Jena, Deutschland) sind asymmetrische Hemicyanine, welche als freie Säuren sowie als NHS-Ester (N-Hydroxysuccinimid-Ester) zu erwerben sind. Letztere sind aufgrund der möglichen Ausbildung kovalenter Bindungen mit Aminogruppen von Antikörpern zur Kopplung an diese geeignet und wurden zur Herstellung der Fluorophor-Antikörper-Sonden verwendet. Die Fluorophore DY-682 und DY-782 liegen mit ihren Absorptions- und Emissionsmaxima im diagnostischen Fenster zwischen 650 und 900 nm, in welchem *in vivo* der Einfluss der Wasser- und Hämoglobinabsorption gering ist (⁴⁸).

In Vorarbeiten durch Toni Luge (⁶⁵) und Tom Schröter (⁶⁶) konnte bereits gezeigt werden, dass die NIR-Fluorophore DY-682 und DY-782 aufgrund der hinreichende Überlappung des Emissionsspektrums des beteiligten Donorfluorophors DY-682 mit dem Absorptionsspektrum vom Akzeptorfluorophor DY-782 ein geeignetes FRET-Paar darstellen (siehe Abbildung 4.1). Die Fluorophore DY-505 und DY-782 konnten hingegen aufgrund der fehlenden Überschneidung des Emissionsspektrums vom DY-505 mit dem Absorptionsspektrum des DY-782 als Negativpaar hinsichtlich des FRET-Effekts ermittelt werden und wurden in dieser Arbeit als Kontroll-Paar eingesetzt (siehe Abbildung 4.1).

I Absorptions- und Emissionsspektren des FRET-Fluorophor-Paares DY-682/DY-782



II Absorptions- und Emissionsspektren des Kontroll-Fluorophor-Paares DY-505/DY-782

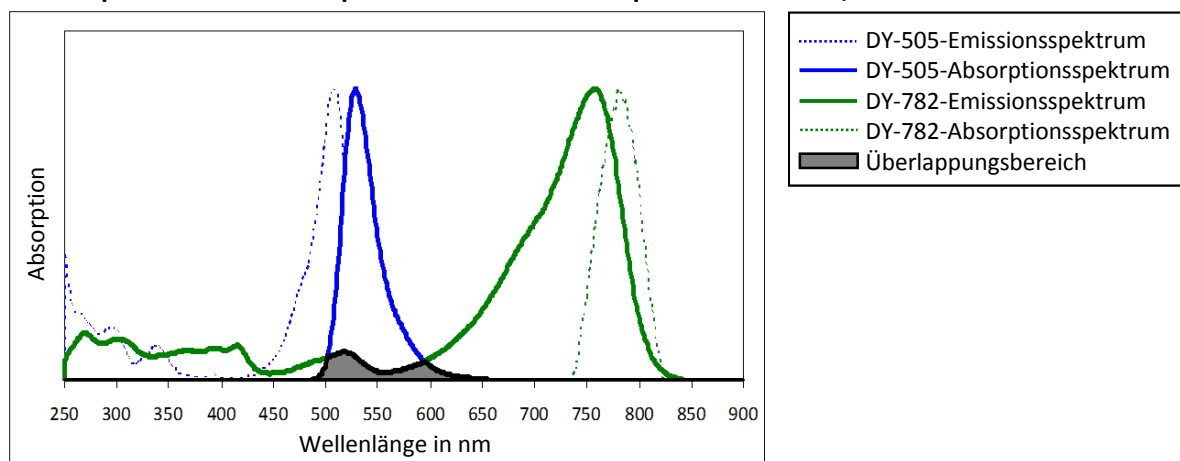


Abbildung 4.1 Absorptions- und Emissionsspektren der in dieser Arbeit verwendeten Dyomics-Fluorophore DY-505 , DY-682 und DY-782 mit Darstellung des Überlappungsbereiches vom Emissionsspektrum des Donorfluorophors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptorfluorophors für das FRET-Paar DY-682/DY-782 (I) und das Kontroll-Paar DY-505/DY-782 (II). Quelle: modifizierte Daten der Dyomics GmbH

Die physikochemischen Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore sowie deren Strukturformeln sind in Tabelle 4.6 sowie in Abbildung 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.6 Physikochemische Eigenschaften der in NHS- (N-Hydroxy-Succinimid-Ester) Konfiguration vorliegenden Fluoreszenzfarbstoffe. Aufgeführt ist neben der molaren Masse, des Absorptions- sowie Emissionsmaximums und des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ auch der Correction Factor der jeweiligen Fluorophore, mit dessen Hilfe sich bei der spektrophotometrischen Analyse der Sondenlösungen (siehe Abschnitt 4.2.2.3) der Anteil der Absorption des Fluorophors bei 280 nm herausrechnen lässt.

	Funktionali- sierung	Molare Masse in g/mol	Absorption in nm*	Emission in nm*	ϵ^* in $M^{-1}cm^{-1}$	Correction Factor
DY-505	NHS	621,1	505	530	80000	0,177
DY-682	NHS	950,0	690	709	140000	0,043
DY-782	NHS	976,1	784	800	170000	0,0987

*Quelle Dyomics GmbH, ermittelt in Ethanol

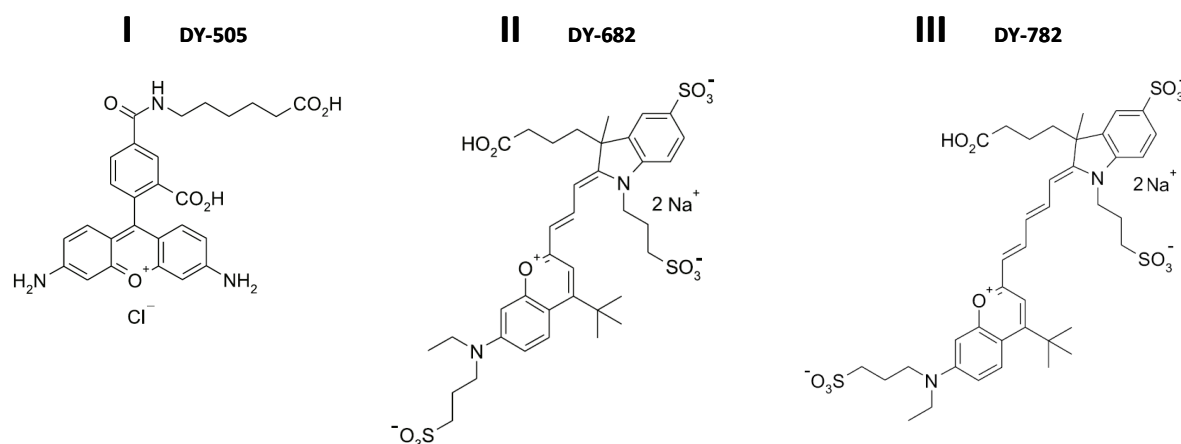


Abbildung 4.2 Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Dyomics-Fluorophore DY-505 (I), DY-682 (II) und DY-782 (III). Quelle: Dyomics Catalogue, 5th Edition, 2007

4.1.7 Antikörper

Die Eigenschaften und Hersteller aller in dieser Arbeit verwendeten Antikörper lassen sich der Tabelle 4.7 entnehmen.

Tabelle 4.7 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper mit Angabe des entsprechenden Wirtes und Epitops sowie des jeweiligen Herstellers und dessen Firmensitz.

Antikörper	Hersteller
Rabbit-serum-IgG	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Goat-anti-rabbit-IgG, HRP konjugiert (0,8 mg/ml)	Jackson ImmunoResearch, New Market, UK
Goat-anti-rabbit-IgG, FITC konjugiert (1 mg/ml)	Millipore Corporation, Schwalbach, Dtl.
Rabbit-anti-human-5-LO (0,2 mg/ml bzw. 2 mg/ml)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A
Rabbit-anti-human-FLAP (0,2 mg/ml bzw. 2 mg/ml)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A

Das für alle Voruntersuchungen zur Herstellung der Modell-Sonde eingesetzte rabbit-serum IgG lag in pulverisierter Form vor und wurde vor der Kopplung mit Fluorophoren in Coupling Buffer (siehe Tabelle 4.4) in einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst.

Alle verwendeten, gegen 5-LO und FLAP gerichteten, Antikörper wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology bezogen und entstammen dem Serum des Wirtes Kaninchen. Zum Expressionsnachweis von 5-LO und FLAP in den untersuchten Zelllinien auf Proteinebene kamen die Antikörper in einer Konzentration von 0,2 mg/ml in PBS (siehe Tabelle 4.4) zum Einsatz. Die zur Herstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden eingesetzten Antikörper wurden hingegen als Sonderformulierung in einer Konzentration von 2 mg/ml in Coupling Buffer bestellt.

4.1.8 Primer

Alle in dieser Arbeit im Rahmen zur Expressionsanalyse der Zellen mittels Real-Time-PCR verwendeten Primer sind in der nachfolgenden Tabelle 4.8 aufgeführt und wurden von der Firma Jena Bioscience GmbH (Jena, Dtl.) bezogen. Sie wurden hierbei allesamt nach einer 1 : 10 Verdünnung in einer Endkonzentration von 10 pmol/μl eingesetzt.

Tabelle 4.8 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer mit Angabe deren Sequenz, Schmelztemperatur [T] und Produktlänge.

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'*	[T] in °C*	Länge in bp*
5-LO			
5-LO_1F_HK	CAC GGG GAC TAC ATC GAG TT	60,0	151
5-LO_1R_HK	GTT TTT GCC GTG TTT CCA GT	56,0	151
FLAP			
FLAP_1F_HK	AGA GCA CCC CTG GCT ACA TA	60,0	145
FLAP_1R_HK	GAG ATG GTG GTG GAG ATC GT	60,0	145
NIP-30			
NIP-30_1F_HK	GGA GGG GAT GAT GGT AAC CT	60,0	203
NIP-30_1R_HK	TCG TAC TCC TGC TGC TTC CT	60,0	203

*Quelle: Jena Bioscience GmbH

Als konstitutiv exprimiertes, nicht reguliertes Referenzgen wurde das kernmembranaktive Protein NIP-30 ausgewählt, da dieses eine den Zielgenen ähnlich starke Expression aufweist und nach der Amplifikation mittels Real-Time-PCR daher als Referenzwert zur Normierung der cDNA-Konzentration der Probe geeignet ist. Bestimmt wurde NIP-30 mit Hilfe von Genevestigator.com einer Mikroarray-Datenbank welche die Expressionsprofile einer Vielzahl von Genen beschreibt.

4.1.9 Proteine

In Tabelle 4.9 sind die verwendeten rekombinant hergestellten Proteine der Firma Abnova GmbH (Heidelberg, Dtl.) aufgeführt.

Tabelle 4.9 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Proteine mit Angabe deren Katalognummern, der Anzahl ihrer Aminosäuren (AS) sowie deren Molekulargewicht (MW) in kDa.

Protein	Katalognummer	Anzahl der AS	MW in kDa
5-LO (ALOX5)	H00000240-P01	911	100,2
FLAP (ALOX5AP)	H00000241-P01	395	43,5

Diese Proteine der 5-Lipoxygenase (5-LO) und des 5-Lipoxygenase aktivierenden Proteins (FLAP) wurden durch den Lieferant mit einem so genannten Glutathion-S-Transferase-Tag (GST-Tag) fusioniert, welcher grundsätzlich eine Proteinaufreinigung mittels Chromatografieverfahren ermöglicht. Das GST-Tag trägt 26 kDa zum Molekulargewicht der Proteine bei und soll deren Löslichkeit sowie Stabilität in Lösung steigern (⁶⁷).

4.1.10 Zelllinien

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Zellversuche wurden die humanen Zelllinien HL-60eos sowie BJ verwendet (siehe Tabelle 4.10).

Tabelle 4.10 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien mit Angabe ihrer Katalognummern, des jeweiligen Herstellers sowie dessen Firmensitz.

Zelllinie	Katalognummer	Lieferant
HL-60eos	96100920	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
BJ	CRL-2522	ATCC, Manassas, USA

4.1.10.1 HL-60eos-Zellen

Die eosinophilen Granulozyten HL-60eos wurden nach Angaben des Herstellers durch Subklonen in Methylzellulose aus der humanen Blutzelllinie HL-60 differenziert und besitzen zu einem gewissen Grad die Fähigkeit sich in diesen Ursprungs-Phänotyp zurückzuwandeln. Ihr Wachstum erfolgte rasch in Suspension, bei 5 % CO₂ und 37 °C im Brutschrank in einem Kulturmedium aus Iscove's Modifiziertes Dulbecco's Medium (IMDM) unter Zusatz von 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FKS). HL-60eos-Zellen werden in der Literatur, wie die meisten Zellen hämatopoetischen Ursprungs, als positiv für 5-LO und FLAP beschrieben (²⁰, ²¹) und sind in dieser Arbeit nach dem Expressionsnachweis auf mRNA- sowie Proteinebene als Positivzelllinie zum Einsatz gekommen.

4.1.10.2 BJ-Zellen

Als potentielle Negativzelllinie in Bezug auf die Expression von 5-LO und FLAP wurden die BJ-Zellen untersucht, welches humane Fibroblasten sind und der Penisvorhaut entstammen. Die Kultivierung dieser sehr langsam wachsenden, adhärenen Zelllinie erfolgte in Minimal Essential Medium (MEM) mit 10 % (v/v) FKS und bei 5 % CO₂ und 37 °C im Brutschrank.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Die Durchführung aller Zellkulturarbeiten erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Strömung, wobei alle Materialien vorher auf geeignete Weise sterilisiert oder direkt steril bezogen wurden. Vor Arbeitsbeginn wurden die verwendeten Lösungen auf 37 °C äquilibriert um über den gesamten Zeitraum eine Konstanz der Wachstumsbedingungen für die Zelllinien zu gewährleisten. Zu Beginn und am Ende aller Arbeiten erfolgte eine Kontrolle der Zellen zur Beurteilung ihrer Morphologie und Dichte im Phasenkontrastmikroskop.

4.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Die in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefrorenen HL-60eos- bzw. BJ-Zellen wurden zur Rekultivierung bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in ein 15 ml Falcon-Tube überführt und anschließend 10 ml des jeweiligen Zellkulturmediums hinzu gegeben. Die nachfolgend durchgeführte Zentrifugation (5 min, 200 x g, 22 °C) diente der Elimination von DMSO, welches den Zellen beim Einfrieren zum Schutz vor intrazellulärer Kristallbildung zugesetzt worden war. In einem weiteren Schritt wurde das Zellpellet in 5 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und anschließend in eine vorbereitete Zellkulturflasche überführt. Nach mikroskopischer Kontrolle der Suspension, erfolgte die Zellkultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank unter regelmäßiger Erneuerung des Nährmediums.

4.2.1.2 Passagieren von Zellen

Um in jeder Kulturflasche die Zellzahl zwischen 1-10 x 10⁶ Zellen zu halten und somit optimale Wachstumsverhältnisse zu schaffen, wurden die HL-60eos- sowie BJ-Zellen alle drei bis fünf Tage passagiert.

Die adhärenenten BJ-Zellen wurden hierzu dreimal mit Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) gewaschen und für wenige Minuten im Brutschrank mit Trypsin zur Ablösung des Zellrasens überschichtet. Nach Überführung der in Kulturmedium resuspendierten Zellen in ein Falcon Tube, wurde die Suspension zur Elimination des Trypsin zentrifugiert (5 min, 200 x g). Beim Passagieren der Suspensionszelllinie HL-60eos wurden die Zellen gesplittet und in frischem Medium aufgenommen. Nach der Zellzahlbestimmung im CASY® (siehe Abschnitt 4.2.1.3) wurden die Zellen zur weiteren Zucht in Zellkulturflaschen überführt oder das entsprechende Volumen der für verschiedene molekularbiologische Untersuchungen benötigten Zellzahl (siehe Tabelle 4.11) in Eppendorf-Cups gegeben.

Tabelle 4.11 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Zellzahl der HL-60eos- sowie BJ-Zellen für die verschiedenen molekularbiologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen

Methode	Eingesetzte Zellzahl
RNA-Isolation mittels High Pure RNA-Isolation Kit	1×10^6
Gesamtproteinextraktion mittels RIPA-Lysepuffer	1×10^6
Detergentienbasierte Membranproteinextraktion	7×10^6
Durchflusszytometrie	1×10^6

4.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzählung mittels CASY® Zellzähler erfolgt durch eine elektrische Impulsanalyse und beruht auf einer Änderung des elektrischen Widerstandes in der Zellsuspension infolge der Verdrängung der Elektrolytlösung durch das Volumen der enthaltenen Zellen. Sie dient der exakten und schnellen Bestimmung von Zellzahl, Zellvolumen und Zellvitalität und erfolgte durch die Zugabe von jeweils 50 µl der passagierten Zellsuspension zu 10 ml der CASY®ton-Flüssigkeit. Nach kurzem Invertieren wurde die Zellprobe unter die Messkapillare des CASY® gestellt und die Zahl der vitalen Zellen pro Milliliter Zellsuspension bestimmt.

4.2.1.4 Stimulation von Zellen

Zur Expressionssteigerung der Targetproteine 5-LO und FLAP wurden die HL60eos-Zellen durch Zugabe von 1 % (v/v) DMSO zu $1,1 \times 10^7$ Zellen stimuliert. Die Inkubation der Zellen mit der Stimulierungsreagenz DMSO erfolgte in einem Zweifachansatz, wobei vom ersten Ansatz nach 4 h und vom zweiten Ansatz nach 24 h jeweils $1,1 \times 10^7$ der stimulierte Zellen geerntet und für nachfolgende Untersuchungen in verschiedene Eppendorf-Cups aufgeteilt wurden.

4.2.2 Herstellung der Sonden

4.2.2.1 Kopplungsreaktion

Die Kopplungsreaktion erfolgte entsprechend des vom Hersteller Dyomics GmbH zur Verfügung stehenden Protokolls durch Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen den Fluorophoren und den Antikörpern der Klasse IgG. Das Protokoll empfiehlt eine Kopplung im Stoffmengenverhältnis von 6 : 1 zwischen Farbstoff und IgG (⁶⁸, persönliche Mitteilung), wobei für die Herstellung der Modell-Sonden zur Ermittlung des optimalen Kopplungsverhältnisses mit maximaler Sondenfluoreszenz durch Reduktion des Quenchingeffekts auch mit Stoffmengenverhältnissen von 3 : 1 sowie 12 : 1 gearbeitet wurde. Die Anfertigung der spezifischen DY-505- und DY-682-Anti-5-LO- sowie der

DY-782-Anti-FLAP-Sonden erfolgte im Anschluss hingegen ausschließlich durch Kopplung in einem Stoffmengenverhältnis von 6 : 1. Zur Herstellung der Sonden wurden die lyophilisierten und als NHS-Ester vorliegenden Fluorophore DY-505, DY-682 und DY-782 zunächst in Dimethylformamid (DMF) gelöst und anschließend mit den in Coupling Buffer (siehe Tabelle 4.4) gelösten Antikörpern für 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) und 900 rpm im Thermoschüttler bei einem pH-Wert von 8-9 inkubiert. Die Ausbildung einer kovalenten Bindung erfolgte dabei durch die nukleophile Substitution der freien reaktiven NHS-Gruppe des Fluorophors durch eine freie Aminogruppe des Antikörpers.

4.2.2.2 Aufreinigung der Sonden

Im Anschluss an das Labeln der Antikörper fand eine Reinigung der Sondenlösung von den im Überschuss zugegebenen, freien Fluorophoren statt. Zur Ermittlung eines hinsichtlich der absoluten Materialverluste sowie der Aufkonzentrierung der finalen Sondenlösung des Antikörpers optimalen Aufreinigungsverfahrens wurden hierbei beispielhaft für die DY-682-Modell-Sonden basierend auf dem Prinzip des Größenausschlusses sowohl das Verfahren der Chromatografie als auch der Ultrafiltration angewandt. Die Aufreinigung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden erfolgte anschließend ausschließlich mittels Ultrafiltration.

4.2.2.2.1 Größenausschlusschromatografie mittels Sephadex-Säule

Die Größenausschlusschromatografie mittels Sephadex-Säule wird auch als Gelfiltration bezeichnet, da das Stoffgemisch hier an einem stark porösen Dextrangel als stationäre Phase fraktioniert wird. Zur Herstellung der Chromatografie-Säule musste das in Pulverform vorliegende Sephadex zunächst für 2-3 Stunden in PBS (siehe Tabelle 4.4) quellen, wobei sich die im modifizierten Dextran vorhandenen Polysaccharidketten bekanntermaßen mit Epichlorhydrin zu einem dreidimensionalen Netzwerk verknüpfen. Vor der Befüllung der 1-2 ml Glaspipetten mit Sephadex wurde die Säule durch Glaswolle im unteren konischen Abschnitt abgedichtet. Auf die nun fertige Sephadex-Säule wurde zunächst die Sondenlösung aufgetragen und anschließend mit der Pufferlösung PBS nachgespült. Die hochmolekularen Sonden sowie ungekoppelte Antikörper konnten ungehindert das poröse Gel passieren und wurden als erste farbige abgrenzbare Fraktion eluiert. Die freien Fluorophormoleküle diffundierten hingegen aufgrund ihrer geringeren Molekülgröße in die Poren des Dextran-Gels, verweilten dort und konnten nach einer verlängerten Retentionszeit als zweite farbige Fraktion eluiert werden.

4.2.2.2.2 Ultrafiltration

Die Aufreinigung der Sondenlösung durch Ultrafiltration erfolgte unter Verwendung von Centrifugal Filter Units, welche mit einem Cut-Off von 10 kDa ein Passagehindernis für die mit 150 kDa hochmolekulare Immunglobuline G darstellten. Nach einmaligem Äquilibrieren der Größenausschlussmembran mit PBS (siehe Tabelle 4.4) wurde die Sondenlösung in die Filter Unit pipettiert. Nach Zentrifugation der Probe bei 450 x g für 4 Minuten wurde das Filtrat entnommen, welches die freien Fluorophore aufgrund ihres geringen Molekulargewichts von < 1 kDa enthielt. Das durch die Membran zurückgehaltene, hochmolekulare Konzentrat wurde in einem zweiten Cup aufgefangen und enthielt die aufgereinigte und konzentrierte Sondenlösung.

4.2.2.3 Spektrophotometrische Analyse der Sondenlösungen

Zur quantitativen Auswertung der Kopplungsreaktion konnte mittels Spektrophotometrie die mittlere Anzahl der pro Antikörper gebundenen Fluorophore, die Dye-Protein-Ratio, ermittelt werden.

Die Analyse der Sondenlösungen erfolgte im Anregungsbereich von 250 - 900 nm gegen PBS (siehe Tabelle 4.4) als Referenzlösung und ergab ein Spektrum mit einem Proteinpeak A_{280} bei 280 nm und einem Farbstoffpeak $A_{Dye\ max}$. Die Berechnung der Dye-Protein-Ratio erfolgte nach Formel 1 auf Grundlage des Lambert-Beer-Gesetzes,

$$\text{Dye – Protein– Ratio} = \frac{c_{Dye}}{c_{IgG}} = \frac{A_{Dyemax} \cdot \epsilon_{IgG}}{A_{280} - (CF \cdot A_{Dyemax}) \cdot \epsilon_{Dye}} \quad \text{Formel 1}$$

wobei c die Konzentration des jeweiligen Fluorophors (c_{Dye}) bzw. Antikörpers (c_{IgG}), A das Absorptionsmaximum des zur Kopplung verwendeten Fluorophors ($A_{Dye\ max}$) bzw. Antikörpers (A_{IgG}) und ϵ der molare Extinktionskoeffizient ist. Weiterhin wurde bei der Berechnung der Dye-Protein-Ratio der vom Hersteller Dyomics GmbH für jeden Fluoreszenzfarbstoff zur Verfügung gestellten Correction Factors (CF) berücksichtigt, mit dessen Hilfe sich der Beitrag der Absorption des Fluorophors zum Proteinpeak bei 280 nm herausrechnen ließ.

4.2.3 Ermittlung der Sondenstabilität

Die Ermittlung der Sondenstabilität zur Festlegung einer Haltbarkeitsgrenze der gekoppelten Sonden erfolgte durch spektrophotometrische Bestimmung der Dye-Protein-Ratios von in PBS (siehe Tabelle 4.4) gelösten und bei 4° C gelagerten Sonden über einen Zeitraum von 8 Wochen.

Hierzu wurden einmalig repräsentativ für alle Modell-Sonden DY-682 und IgG in einem Stoffmengenverhältnis von 6 : 1 gekoppelt und anschließend aliquotiert. Zu dem entsprechenden Messzeitpunkt (nach 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 8 Wochen) wurden die Sondenlösungen jeweils im Dreifachansatz mittels Ultrafiltration aufgereinigt und das Konzentrat anschließend einer spektrophotometrischen Untersuchung unterzogen (siehe Abschnitt 4.2.2.3). Die Berechnung und der nachfolgende Vergleich der Dye-Protein-Ratios in Abhängigkeit des Messzeitpunkts ermöglichte quantitative Aussagen bezüglich des Zerfalls der Sonden.

Weiterhin wurde die Haltbarkeit der Fluorophore am Beispiel von DY-682 analog zur Sondenstabilität ermittelt, wobei nicht die Dye-Protein-Ratio sondern die Stoffmenge der Fluorophore in PBS über 8 Wochen herangezogen wurde.

4.2.4 Fixierung der Proben auf Membranen

Zur Beurteilung der Fluoreszenzintensitäten sowie eines FRET-Effekts der freien Fluorophore und Sonden unter Minimierung möglicher Einflussgrößen wurden die Proben auf Blot-Membranen fixiert und anschließend multispektral untersucht (siehe Abschnitt 4.2.2.3). Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Proben, wurde bei der punkweisen Auftragung der Fluorophor- bzw. Sondenlösungen auf ein einheitliches Volumen von 1 - 5 µl mit der Konsequenz ähnlicher Spotflächen (0,03-0,15 cm²) geachtet. Die zur Bestimmung des molaren Detektionslimits - also der für eine erfolgreiche Detektion der fixierten Fluorophor- bzw. Sondenlösungen mittels MaestroTM-Nah-Infrarot-Kleintier-Scanner (siehe Abschnitt 4.2.5) minimal pro Spot benötigten Fluorophorstoffmenge - erfolgte durch Auftragung von Proben mit Stoffmengen zwischen 0,00125 nmol und 0,04 nmol Fluorophor pro Spot. Alle weiteren Versuche erfolgten mit einer konstanten Stoffmenge von 0,01 nmol Fluorophor pro Spot (entsprechende Fluorophorkonzentrationen: 94,8 - 318,5 pmol/cm²) zur optimalen Vergleichbarkeit der Proben bei maximal möglicher Fluoreszenzintensität unter minimalem Materialaufwand.

4.2.4.1 Nitrocellulosemembran

Die negativ geladene Nitrocellulosemembran bindet Proteine und andere Proben durch hydrophobe Wechselwirkungen mit einer hohen Kapazität (⁶⁹). Diese nicht-kovalente Bindung setzte keine Vorbehandlung oder Benetzung der Membran voraus, sondern erfolgte allein durch das Auftragen von 1 - 5 µl der 94,8 —318,5 pmol/cm² Fluorophor enthaltenden Probenlösung auf die trockene Membran.

4.2.4.2 PVDF-Membran

Die hydrophobe Polyvinylidendifluorid-beschichtete Membran ist bekanntermaßen sowohl mechanisch als auch chemisch stabiler im Vergleich zur Nitrocellulosemembran. Voraussetzung für die Auftragung von 1 - 5 µl der 94,8 - 318,5 pmol/cm² Fluorophor enthaltenden Probenlösung war allerdings die Benetzung der Membran für einige Sekunden in 100 %igem Methanol und eine anschließende 2 - 5 minütige Inkubation in Aqua dest. sowie die Äquilibration in einer in den entsprechenden Versuchsprotokollen beschriebenen Pufferlösung (siehe Tabelle 4.4). Dies steigerte die Bindungskapazität der hydrophoben Membran und ermöglichte einen homogenen Transfer der Proteine aus dem Gel auf eben diese PVDF-Membran. Die Bindung der Proben an die Membran erfolgte auch hier durch nicht-kovalente Wechselwirkungen (⁷⁰).

4.2.5 Darstellung von Farbstoffen und Sonden mittels Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Kleintier-Scanner

Der zur Darstellung von Farbstoffen und Sonden auf Membranen verwendete MaestroTM-Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Kleintier-Scanner ist ein multispektrales Imaging-System zur Messung von Fluoreszenzfarbstoffen im sichtbaren und Nah-Infrarotbereich *in vitro* sowie *in vivo*.

4.2.5.1 Aufbau und Funktionsweise des Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Scanners

Der Aufbau dieses MaestroTM-Fluoreszenz-Imagers ist in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt. Er besteht aus den drei Hauptkomponenten: Belichtungsmodul (a), Bildgebungsmodul (b) und PC mit der Auswertungssoftware MaestroTM 2.10.0 (c).

Das Belichtungsmodul beinhaltet zur Anregung der auf einer Membran fixierten Fluorophorprobe eine 300 W Xenonlichtquelle, der ein entsprechend ausgewählter Bandpass-Anregungsfilter (siehe Tabelle 4.12), zur selektiven Passage von Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs, vorgeschaltet wurde. Durch die vier flexiblen Glasfaserarme wurde das Anregungslicht anschließend in die Dunkelkammer, zur auf dem höhenverstellbaren Objektisch befindlichen membrangebundenen Fluorophorprobe (siehe Abschnitt 4.2.4) geleitet und diese somit zum Fluoreszieren angeregt. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte im Bildgebungsmodul durch eine hochempfindliche CCD-Kamera (696 x 520 Pixel) mit einem Spektrometer, welches spektral aufgelöste Aufnahmen mit 10 nm Schrittweite ermöglichte. Vor die Kamera wurde ein passend gewählter Longpass-Emissionsfilter (siehe Tabelle 4.12) installiert, welcher nur Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge durchließ.

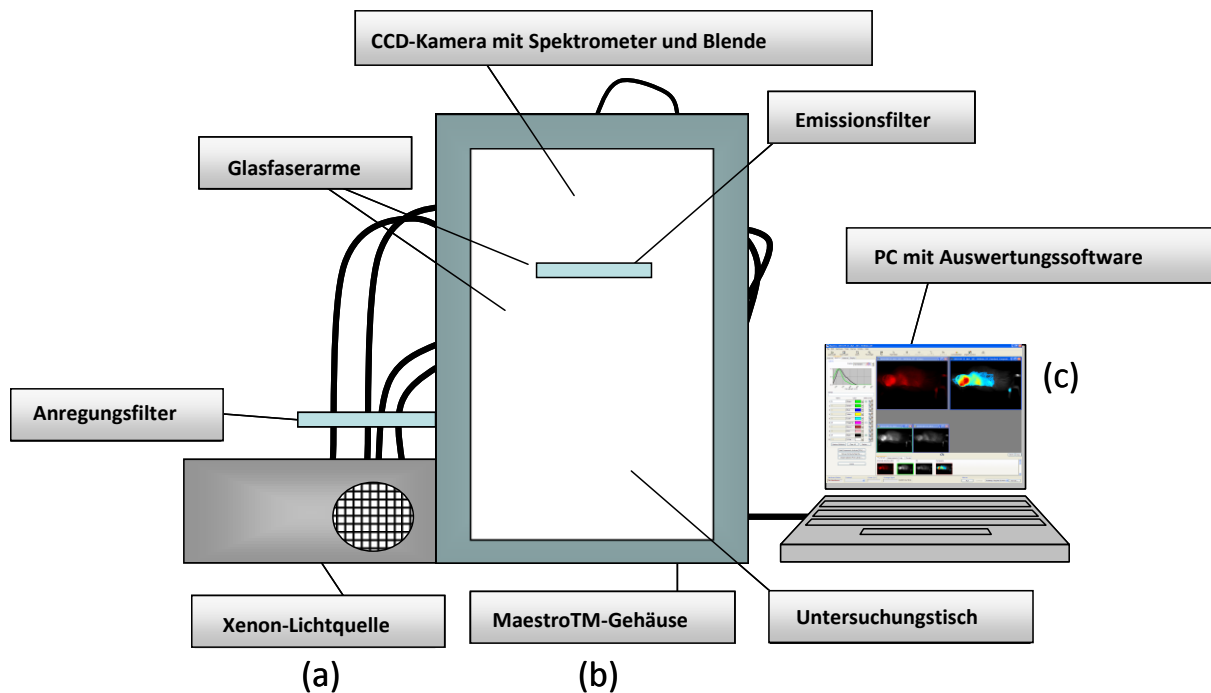


Abbildung 4.3 Schematischer Aufbau des Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Kleintier-Scanners (modifiziert nach Dees F.) Belichtungsmodul (a): Die Anregung der Probe erfolgte mittels einer Xenon-Lichtquelle, welcher ein Anregungsfilter zur Reduktion der spektralen Bandbreite des passierenden Lichtes vorgeschaltet wurde. Bildgebungsmodul (b): Dieses Anregungslicht wurde durch die Glasfaserarme in die Dunkelkammer geleitet, in welcher sich die membrangebundene fluorophorhaltige Lösung auf dem Untersuchungstisch befand. Die Detektion erfolgte mittels einer CCD-Kamera, vor der ein Emissionsfilter zur Selektion des durchgehenden Lichtes oberhalb einer bestimmten Wellenlänge installiert wurde. Auswertungssoftware (c): Die Analyse der Daten erfolgte anschließend über einen Computer mittels der Auswertungssoftware MaestroTM 2.10.0.

Die Modifizierung einzelner Parameter zur Erstellung dieser multispektralen Aufnahme erfolgte mittels der zugehörigen Software MaestroTM 2.10.0. So diente zum Beispiel die manuelle Einstellung der Belichtungszeit der Vermeidung überbelichteter Aufnahmen sowie der Vergleichbarkeit verschiedener Messreihen.

4.2.5.2 Auswertung der Aufnahmen

Die Erstellung und nachfolgende Bearbeitung der multispektralen Aufnahme der membrangebunden fluorophorhaltigen Probenlösungen erfolgte mittels der Auswertungssoftware MaestroTM 2.10.0. Die hierbei zunächst generierte Summendarstellung aller spektralen Aufnahmen wird als „Cube“ bezeichnet und entspricht der Gesamtfluoreszenzdarstellung im durch den Emissionsfilter selektierten Wellenlängenbereich (siehe Abbildung 4.4 I). Die Identifikation eines jeden Fluorophors anhand des Spektrums ermöglichte eine pixelweise Separation der Farbstoffe („linear unmixing“) und diente neben dem nachträglichen Herausrechnen der Autofluoreszenz von den gewünschten Fluoreszenzsignalen auch der isolierten Darstellung jedes Fluorophors einer Probe. Hierbei wurde jedem Fluorophor eine Farbe zugeordnet wobei DY-505 blau,

DY-682 rot, DY-782 grün und der Autofluoreszenz schwarz zugewiesen wurde. Die so entstandenen Komponentenbilder (siehe Abbildung 4.4 II) konnten nun einzeln betrachtet und hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität, die als Maß der Konzentration diente, beurteilt werden.

Zur semiquantitativen Auswertung der Komponentenbilder wurden auf die interessierenden Bildbereiche Areale identischer Größe und Pixelanzahl, so genannte „regions of Interest“ (ROI's), gelegt und durch Analyse der Fläche unter den Spektren (AUC = area under the curve) der Mittelwert des Signals aller im Bereich enthaltenen Pixel bezogen auf die Expositionszeit (average counts/sec) bestimmt (siehe Abbildung 4.4 III).

Die semiquantitative, optische Darstellung der verschiedenen Signalintensitäten für jeweils einen Fluorophor erfolgte durch die Farbkodierung der Aufnahmen mittels der Auswertungssoftware MaestroTM 2.10.0, wobei die Farbe Blau signalarmen und Rot signalreicheren Arealen zugeordnet wurde (siehe Abbildung 4.4 IV).

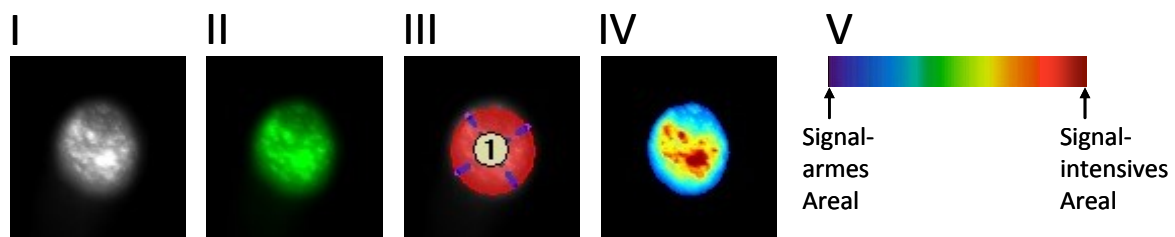


Abbildung 4.4 Analyse und Bearbeitung der spektralen Fluoreszenzaufnahmen mittels der Auswertungssoftware MaestroTM 2.10.0 I Gesamtfluoreszenz aller spektralen Aufnahmen im durch den Emissionsfilter selektierten Wellenlängenbereich – der „Cube“. Ausgehend von dieser Aufnahme wurden die einzelnen Farbstoffe aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzspektren identifiziert und anschließend pixelweise separiert, weswegen die entstehenden Abbildungen, in denen jedem Fluorophor eine Falschfarbe zugeordnet wurde, als Komponentenbilder (II) bezeichnet werden. Zur semiquantitativen Auswertung der Komponentenbilder wurden in die interessierenden Signalbereiche so genannte ROI's (region's of interest) gelegt und somit der Mittelwert der Signale dieses Areals bezogen auf die Expositionszeit bestimmt (III). Die semiquantitative optische Darstellung der verschiedenen Signalintensitäten eines Farbstoffes erfolgte durch Farbkodierung der Aufnahme (IV) entsprechend der in V dargestellten Skala.

4.2.5.3 Detektion der Fluorophore und Nachweis des FRET-Effekts *in vitro*

Zur Detektion der Fluorophore, der Beurteilung ihrer Fluoreszenzintensität und dem Nachweis des FRET-Effekts wurden die verwendeten Fluorophore sowie die hergestellten Sonden nach Fixierung auf Membranen (siehe Abschnitt 4.2.4) *in vitro* mittels MaestroTM-Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Kleintier-Scanner bildgebend dargestellt.

Die Bestimmung des molaren Detektionslimits, also der für eine erfolgreiche Detektion der fixierten Fluorophor- bzw. Sondenlösungen mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager minimal pro Spot benötigten Fluorophorstoffmenge, erfolgte durch das Erstellen und Auftragen der Modell-Sondenlösungen DY-505-, DY-682- sowie DY-782-Anti-IgG in jeweils einer Konzentrationsreihe von 0,00125 - 0,04 nmol Fluorophor/Spot (entspricht 6,5 - 203,8

pmol/cm²) auf Nitrocellulosemembranen. Die Membranen wurden anschließend unter den auf Grundlage des Absorptions- und Emissionsmaximums des jeweiligen Fluorophors ausgewählten, optimalen Filterkombinationen (siehe Tabelle 4.12) im MaestroTM-Fluoreszenz-Imager vermessen, die Spots entsprechend der in Abschnitt 4.2.5.2 beschriebenen Vorgehensweise ausgewertet und die Signalintensitäten verglichen.

Tabelle 4.12 Auflistung der untersuchten Fluorophore (mit Angabe des Absorptionsmaximums A_{\max} und Emissionsmaximums Em_{\max}) und der für ihre Vermessung mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager eingesetzten Filterkombinationen. Die verwendeten Anregungs- und Emissionsfilter sind hierbei unter Angabe des Wellenlängenbereichs des selektiv passierenden Lichtes aufgeführt.

Fluorophore	Anregungsfilter	Emissionsfilter
DY-505 (A_{\max} 505 nm, Em_{\max} 530 nm)	Blue (445 bis 490 nm)	Blue (515 nm Longpass)
DY-682 (A_{\max} 690 nm, Em_{\max} 709 nm)	Red (615 bis 665 nm)	Red (700 nm Longpass)
DY-782 (A_{\max} 784 nm, Em_{\max} 800 nm)	NIR (710 bis 760 nm)	NIR (800 nm Longpass)
FRET-Paar DY-682/DY-782	Red (615 bis 665 nm)	Red (700 nm Longpass)
Kontroll-Paar DY-505/DY-782*	Blue (445 bis 490 nm)	Red (700 nm Longpass)
	Blue (445 bis 490 nm)	Blue (515 nm Longpass)
	Red (615 bis 665 nm)	Red (700 nm Longpass)
SYPRO®-Ruby-Fluorophor ($A_{\max1}$ 280 nm, $A_{\max2}$ 450 nm, Em_{\max} 618 nm)	Green (503 bis 555 nm)	Green (580 nm Longpass)

* Aufnahmen mit manueller Einstellung der Belichtungszeit entsprechend der DY-682/DY-782-Messung

Zur Untersuchung der Fluoreszenzintensität der FLAP- bzw. 5-LO-Sonden erfolgte ein Signalstärkenvergleich von auf eine PVDF-Membran fixierten Probenlösungen der DY-505- und DY-682-Anti-5-LO- sowie der DY-782-Anti-FLAP-Sonden mit fluorophormengen-äquivalenten Farbstofflösungen. Der Probenauftrag erfolgte hierbei mit 0,01 nmol pro Spot (94,8 pmol/cm²) und zur Vermessung der Membranen im MaestroTM-Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Kleintier-Scanner wurden entsprechend des eingesetzten Fluorophors die Filterkombinationen der Tabelle 4.12 verwendet.

Die Analyse eines Energietransfers zwischen den Fluorophoren zum Nachweis des FRET-Effekts erfolgte sowohl für das FRET-Paar DY-682/DY-782 als auch das Kontroll-Paar durch den Fluoreszenzintensitätsvergleich des Donor- bzw. Akzeptorsignals in An- und Abwesenheit des jeweilig anderen Farbstoffes. Die Fixierung der fluorophorhaltigen Probenlösungen auf der Membran erfolgte durch Auftragung von jeweils 0,01 nmol Fluorophor pro Spot, welches einer Fluorophorkonzentration von 179 pmol/cm² für die Untersuchungen der FRET-Eigenschaften der Fluorophore und 94,8 pmol/cm² für die Analysen der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden entsprach. Nach dem Auftragen des

Donor- bzw. Akzeptorfluorophors auf der Membran in separaten Spots wurden zunächst die Fluoreszenzsignale der Fluorophore einzeln unter den für den jeweiligen Farbstoff optimalen Filterkombinationen (siehe Tabelle 4.12) im MaestroTM-Fluoreszenz-Imager vermessen. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Signalintensität des Donors bzw. Akzeptors in Anwesenheit des jeweils anderen Fluorophors durch die infolge einer gemeinsamen Fixierung beider Fluorophore auf einen Spot der Membran geschaffene hohe räumliche Konzentrierung von Donor und Akzeptor. Zum Nachweis des FRET-Effekts dieser sowohl Donor- als auch Akzeptor enthaltenden Probenlösungen wurde ein zur Anregung des Donorfluorophors optimaler Exzitations- und zur Detektion des Akzeptorfluorophors geeigneter Emissionsfilter ausgewählt (siehe Tabelle 4.12). Für das Kontroll-Paar DY-505/DY-782 kamen weitere der Tabelle 4.12 zu entnehmenden Filterkombinationen zum Einsatz, welche dem Nachweis der einzelnen Fluorophore in der fixierten Probenlösung dienten. Im Anschluss wurden die im entstandenen Cube dargestellten Fluoreszenzsignale der verschiedenen Farbstoffe anhand ihres jeweiligen Spektrums identifiziert, hinsichtlich der Donor- und Akzeptorsignalkomponente isoliert und anschließend quantitativ ausgewertet.

4.2.6 Nachweis der Bindungsfähigkeit der Sonden mittels Dot Blot

Zum Nachweis der Bindungsfähigkeit der hergestellten Modell- sowie spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden wurden diese mittels Dot Blot-Technik untersucht.

In der vorliegenden Arbeit sollte durch das direkte Auftragen der in Tabelle 4.13 aufgeführten Antigenproben (rabbit-serum-IgG bzw. 5-LO-/FLAP- Reinprotein) auf eine PVDF-Membran und der anschließenden Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper (Fluorophor-rabbit-anti-rabbit-serum-IgG bzw. Fluorophor-rabbit-anti-human-5-LO-/FLAP-IgG) die Spezifität der Antikörper-Protein-Bindung untersucht werden, wobei die in den verschiedenen Versuche verwendeten Substanzen der Tabelle 4.13 zu entnehmen sind.

Tabelle 4.13 Verwendete Substanzen der in dieser Arbeit mittels Dot-Blot durchgeführten Nachweise der Bindungsfähigkeit der Modell- sowie der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden. Aufgelistet sind hierbei die auf die Membranen aufgetragenen Proteinproben sowie die zur Inkubation eingesetzten Primär- bzw. HRP- (horse radish peroxidase) konjugierten Sekundärantikörper mit Angabe deren Konzentrationen.

Bindungsfähigkeit	Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Modell-Sonden	rabbit-serum-IgG (1-4 µg)	Fluorophor-rabbit-anti-rabbit-serum-IgG-Sonden (0,01 nmol)	Goat-anti-rabbit-IgG, HRP konjugiert (1 : 5000)
Spezifische FLAP- bzw. 5-LO-Sonden	5-LO-/FLAP-Reinprotein (1-4 µg)	Fluorophor-rabbit-anti-human-5-LO-/FLAP- IgG-Sonden (0,01 nmol)	Goat-anti-rabbit-IgG, HRP konjugiert (1 : 5000)

Zunächst wurde die PVDF-Membran den in Abschnitt 4.2.4.2 beschriebenen Vorbereitungen unterzogen. Anschließend erfolgte der Antigenauftrag entsprechend der Tabelle 4.13 mit 1-4 µg Protein pro Dot, sowie der Auftrag von A. dest. als Negativkontrolle zur Beurteilung der unspezifischen Bindung des eingesetzten Primärantikörpers. Als Positivkontrolle wurde ein Dot der jeweiligen Primärantikörper-Sonde (0,01 nmol/Dot; entspricht je nach Sondenlösung 115 – 318,5 pmol/cm²) mitgeführt, mit welchem der Erfolg der Bindung des sekundären Antikörpers an den aufgetragenen Primärantikörper sowie der Erhalt der Fluoreszenzeigenschaften unter Behandlung der Membran im Rahmen der Versuche bewertet werden sollte. Nach dem Austrocknen der PVDF-Membran bei RT für 10 - 15 min wurden die unspezifischen Bindungsstellen für eine Stunde mit Blockpuffer I (siehe Tabelle 4.4) abgesättigt und anschließend die Membran mit einer in Verdünnungspuffer I (siehe Tabelle 4.4) gelösten, 0,01 nmol Fluorophor enthaltenden Primärantikörper-Sonde inkubiert. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten hierbei auf dem Taumelmischer bei 21 rpm und RT. Das Entfernen des ungebundenen Primärantikörpers erfolgte durch einmaliges Waschen der Membran in Verdünnungspuffer I (5 min) und dreimaliges Waschen in Waschpuffer (siehe Tabelle 4.4) für jeweils 5 min. Die getrocknete Membran konnte anschließend im MaestroTM-Fluoreszenz-Imager vermessen werden (siehe Abschnitt 4.2.5).

In einigen Versuchen wurde mit dem Ziel der Steigerung des optischen Signals der Sonde eine Inkubation der Dot-Blot-Membran mit einem in Waschpuffer 1 : 5000 gelösten, HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1 h, RT, 21 rpm) zur Signalamplifikation durchgeführt. Die nachfolgenden Waschschrte sowie die Detektion des Lumineszenzsignals erfolgte äquivalent zu den letzten Schritten der in Abschnitt 4.2.8.2.5 beschriebenen Immunfärbung.

4.2.7 Proteinfärbungen

Mit Hilfe verschiedener Proteinfärbungen ließ sich die Bindungseffizienz der Proteine auf der Transfermembran und somit der Erfolg des Blot-Vorgangs nachweisen, wobei alle nachfolgenden Versuche sofern nicht anders beschrieben bei RT und 21 rpm auf dem Taumelmischer (siehe Tabelle 4.1) durchgeführt und anhand des nachweisspezifischen Farbumschlags des entsprechenden Spots beurteilt wurden.

4.2.7.1 Ponceau-Rot-Färbung

Bei der Proteinfärbung mittels Ponceau-Rot erfolgt die Bindung des anionischen, hydrophilen Diazofarbstoffes Ponceau S reversibel an positiv-geladene Aminogruppen (⁷¹) und ermöglicht dadurch eine Detektion von Proteinenmengen > 200 ng/Spot (⁷²). Die Inkubation des Blots für 5 min in Ponceau-Rot-Lösung

(0,2 % Ponceau in 3 % TCA) diente der Färbung der auf der Membran befindlichen Proteine. Eine anschließende einmalige Waschung mit A. dest. (10 - 15 min) erfolgte zur Entfernung des ungebundenen Farbstoffes und weitere Waschgänge ermöglichten eine vollständige Entfärbung der Membran.

4.2.7.2 Amidoschwarz-Färbung

Die Amidoschwarz-Färbung gehört zu den irreversiblen Protein-Färbungen und ermöglicht den Nachweis von Proteinen mit einer Detektionsgrenze von $> 50 \text{ ng/Spot}$ (⁷²). Zur Färbung wurde die Membran für 2 h in Amidoschwarzlösung (siehe Tabelle 4.4) inkubiert, wobei sich der Azofarbstoff an den Amidostickstoff des Proteins bindet (⁷³). Der ungebundene Farbstoff wurde in 7 %iger Essigsäure in A. dest. (3 x 5 min) unter mehrfachem Wechsel der Waschlösung und anschließender Inkubation in A. dest. für 10 - 15 min von der Membran entfernt.

4.2.7.3 Coomassie-Färbung

Die Proteinfärbung mittels des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie ermöglicht die Visualisierung von Proteinmengen $> 10 \text{ ng/Spot}$ (⁷²). Die Färbung der Membran erfolgte durch Inkubation in der sauren Coomassie-Färbelösung (siehe Tabelle 4.4) für 30 min, wobei das in der Färbelösung enthaltende Methanol die Denaturierung des Proteins bewirkt und durch Bindung des Coomassie Brilliant Blue R-250-Farbstoffes an die basischen und aromatischen Aminosäuren sowie an Histidin eine Markierung des Proteins stattfindet (⁷⁴). Zur Reduktion des Hintergrundsignals wurde die Membran in Entfärbelösung (siehe Tabelle 4.4) für eine Stunde inkubiert und anschließend mehrfach mit Aqua dest. gewaschen.

4.2.7.4 SYPRO®-Ruby

Mittels der SYPRO®-Ruby-Proteinfärbung ist die Visualisierung von Proteinen mit einer hohen Sensitivität von 2 - 8 ng Protein pro Spot möglich (⁷⁵). Hierzu wurde die Membran zunächst kurz mit Methanol benetzt und anschließend unter Wechsel der Lösungen mit Aqua dest. gewaschen (4 x 5 min). Die nachfolgende Färbung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers durch Inkubation der Membran mit dem fluoreszierenden „SYPRO®-Ruby Protein Blot Stain“ für 15 Minuten. Zum Entfernen des ungebundenen Farbstoffes wurde die Membran zwei- bis dreimal für 1 Minute mit Aqua dest. überspült. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Detektion der Fluoreszenz des SYPRO®-Ruby-Fluorophors (Ex.: 280/450 nm, Em.: 618 nm) mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager bei einer Anregungswellenlänge von 503 - 555 nm (siehe Tabelle 4.12).

4.2.8 Expressionsnachweis von 5-LO und FLAP in HL-60eos- und BJ-Zellen

Zur Entwicklung eines geeigneten Zellmodells für die *in vitro*-Analyse der FRET-Sonden, wurden die HL-60eos- sowie BJ-Zellen auf ihre Expression von 5-LO und FLAP untersucht, um diese als Positiv- bzw. Negativzelllinien zu bestätigen.

4.2.8.1 Expressionsnachweis auf mRNA-Ebene

Der Expressionsnachweis der Targetproteine in den Zelllysaten der HL-60eos sowie der BJ-Zellen erfolgte auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time-PCR und diente der Gewinnung von Erkenntnissen bezüglich der derzeitigen Proteinsynthese der Zellen.

4.2.8.1.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem High Pure RNA Isolation Kit von Roche und den darin enthaltenen Lösungen nach Herstellerangaben bei Raumtemperatur in Filter-Tubes, wobei die mittels Collection-Tubes aufgefangenen Lösungen - sofern nicht anders beschrieben - verworfen wurden. Nach Resuspendierung der Zellpellets in 200 µl PBS (siehe Tabelle 4.4) und anschließendem Vortexen der Suspension in 400 µl des im Kit enthaltenen Lysepuffers für 15 s folgte die Zentrifugation der lysierten Zelllösung (15 s, 8000 x g). Durch Inkubation der Filtermembran der von Hersteller zur Verfügung gestellten Filter-Tubes mit einem Gemisch aus DNase-Incubation Buffer sowie DNase I für 15 min wurde die im Filter verbliebenen DNA hydrolysiert und somit eine Amplifikation der DNA in nachfolgenden Schritten verhindert. Die sich anschließenden Wasch- und Zentrifugationsschritte mit den im Kit enthaltenen Waschpuffern dienten der Elimination von Zelltrümmern, Salzen, Proteinen und DNA-Resten. Die Ablösung der RNA aus der Membran wurde durch Zugabe von 50 µl Elution-Buffer (im High Pure RNA Isolation Kit enthalten) und nachfolgender Zentrifugation (1 min, 8000 x g) in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß erzielt. Die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels NanoDropTM durch Bestimmung der Absorbanz bei 260 nm und Anwendung des Lambert-Beer-Gesetzes.

4.2.8.1.2 Reverse Transkription

Ziel der reversen Transkription mittels QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit war die Synthese der komplementären cDNA, zur zuvor isolierten Template-RNA.

Zur Zerstörung von noch aus dem Zellpellet verbliebenen DNA-Resten wurde zunächst nach folgendem Schema (siehe Tabelle 4.14) gDNA-Wipeout-Buffer und RNase freies Wasser dem RNA-Eluat zugesetzt und die Probe für 2 min bei 42 °C im Thermocycler inkubiert.

Tabelle 4.14 Auflistung der Komponenten des im Rahmen der reversen Transkription zur Zerstörung der DNA-Reste verwendeten Reaktionsmixes (QuantiTect® Reverse Transcription Kit) mit Angabe des eingesetzten Volumens sowie der dadurch erzielten Endkonzentrationen.

Komponente	Volumen pro Reaktion	Finale Konzentration
gDNA Wipeout Buffer (7 x)	2 µl	nach Herstellerangaben
Template RNA	x µl	0,07 µg / µl
RNase freies Wasser	Auffüllen auf 14 µl	-

Zur eigentlichen Umschreibung der RNA in die stabilere cDNA wurden der Probe im Anschluss nach dem in Tabelle 4.15 aufgeführten Pipettierschema reverse Transkriptase (enthält RNase Inhibitor), Oligo-dT- und Hexamer-Primer sowie eine dNTP-enthaltende Pufferlösung zugesetzt und für 30 min ebenfalls bei 42° C inkubiert.

Tabelle 4.15 Auflistung der Komponenten des im Rahmen der reversen Transkription zur Synthese von cDNA verwendeten Reaktionsmixes (QuantiTect® Reverse Transcription Kit) mit Angabe des eingesetzten Volumens sowie der dadurch erzielten Endkonzentrationen.

Komponente	Volumen pro Reaktion	Finale Konzentration
Quantiscript® reverse transcriptase	2 µl	4 units / µl
Oligo-dT- und Hexamer-Primer	2 µl	1 µM
Quantiscript® reverse transcriptase Buffer (5 x)	2 µl	nach Herstellerangaben

Nach dem anschließenden Erhitzen der Reaktionslösung auf 95 °C für 3 min zur Inaktivierung der reversen Transkriptase konnte die synthetisierte cDNA zur Expressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time-PCR verwendet oder bei -20 °C aufbewahrt werden.

4.2.8.1.3 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion stellt eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren nach dem Prinzip der herkömmlichen PCR dar, die jedoch basierend auf Fluoreszenzmessungen zusätzlich eine Quantifizierung der synthetisierten DNA-Fragmente in Echtzeit ermöglicht. Grundlage der Quantifizierung der PCR-Produkte war hierbei die Messung der Fluoreszenz des im Mastermix (Tabelle 4.16) enthaltenen, interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR®Green am Ende der Elongation jedes PCR-Zyklus, welche sich proportional zu der Menge der entstehenden DNA-Fragmente verhielt. Die Expressionsanalysen dienten neben dem Nachweis von 5-LO und FLAP in den ausgewählten Zelllinien auch dem Vergleich der 5-LO- sowie FLAP-RNA-Konzentrationen in BJ-Zellen sowie mit DMSO stimulierten HL-60eos-Zellen mit denen der unbehandelten HL-60eos-Zellen.

Vorbereitung der cDNA-Proben

Zur Amplifikation der durch reverse Transkription gewonnenen cDNA wurde zunächst für jedes 200 µl-Reaktionsgefäß der in Tabelle 4.16 aufgeführte Reaktionsmix in zweifacher technischer Wiederholung hergestellt. Hierbei wurden vor der Durchführung der eigentlichen PCR-Läufe, zum Expressionsnachweis der Zielgene 5-LO und FLAP, zunächst Verdünnungsreihen (unverdünnt, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1.000, 1 : 10.000) der synthetisierten Standard-cDNA aus HL-60eos-Zellen im Dreifachansatz für jeden Primer erstellt. Die Amplifikationsraten dieser cDNA-Proben bekannter Konzentrationen dienten im Anschluss an das Durchlaufen der Real-Time-PCR der Erstellung von Standardkurven und somit der Beurteilung der Effizienz der PCR-Reaktion (siehe „Quantifizierung der Real-Time-PCR“). Diese Standard-cDNA wurde neben der eigentlichen cDNA-Probe sowie einer Non-Template-Control in jedem PCR-Lauf mitgeführt. Diese Kontrolle, bei der das cDNA-Volumen des Reaktionsansatzes durch DEPC-H₂O ersetzt wurde, diente der zur Quantifizierung der Real-time-PCR (siehe „Quantifizierung der Real-Time-PCR“) unentbehrlichen Erfassung des Fluoreszenzhintergrundes jeder Messung.

Tabelle 4.16 Auflistung der Komponenten des im Rahmen der Real-time-PCR-Läufe zur Vervielfältigung der synthetisierten cDNA hergestellten Reaktionsansatzes mit Angabe des eingesetzten Volumens.

Komponente	Volumen pro Reaktion
cDNA	2 µl
Mastermix QuantiTect (2 x)	10 µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	2 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	2 µl
DEPC-H ₂ O	Auffüllen auf 20 µl

Nach der Herstellung des Reaktionsansatzes wurden die Reaktionsgefäße zur Vervielfältigung der cDNA in den Rotor-Gene®Q -Thermocycler gegeben und mittels der zugehörigen Software die für Primer sowie den Mastermix optimalen Reaktionsbedingungen (siehe Tabelle 4.17) eingestellt.

Tabelle 4.17 Darstellung der Einzelschritte des zur Amplifikation der cDNA verwendeten Programmes im Rotor-Gene®Q-Thermocycler mit Angabe von Temperatur, Zeit sowie der Anzahl der durchgeführten Zyklen.

	Temperatur in °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initialer Schritt	95	15 min	1 x
Denaturierung	94	15 sec	40 x
Annealing	60	30 sec	
Elongation	72	30 sec	

In einem initialen Schritt der Denaturierung erfolgte das Aufbrechen der Doppelhelix beim Erhitzen der Template-DNA auf 95 °C durch Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren. Der nachfolgende Annealing-Schritt fand bei der optimalen Primer-Temperatur von 60 °C statt und diente dem Hybridisieren der Primer an die DNA. Zum Abschluss jedes Zyklus wurde die thermostabile DNA-Polymerase, durch Erhöhung der Temperatur auf ihr Arbeitsoptimum, zur Doppelstrangsynthese angeregt. Das Durchlaufen dieser Schritte in 40 Zyklen bewirkte als Ergebnis der PCR die exponentielle Vervielfältigung der DNA-Fragmente.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden anschließend mittels einer Schmelzkurve analysiert, welche die erste negative Ableitungsfunktion der Fluoreszenzintensität gegenüber der Temperatur (von 72 °C bis 97 °C) darstellt. Am Schmelzpunkt weisen diese Kurven aufgrund der Denaturierung der DNA-Moleküle infolge dessen es zur Ablösung des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR®Green kommt, ein lokales Maximum in der Abnahme der Fluoreszenzintensität auf. Dieses Peakmaximum der Schmelzkurven kennzeichnet die für jedes Primerprodukt charakteristische Schmelztemperatur und diente somit der Untersuchung der PCR-Produkte hinsichtlich ihrer Spezifität. Während die Schmelzkurvenanalyse eine erste Unterscheidung zwischen entstandenen Primer-Dimeren und spezifischen PCR-Produkten ermöglichte, erfolgte die eigentliche quantitative Auswertung der Real-Time-PCR durch die Untersuchung der entstandenen Amplifikationskurven, welche die Fluoreszenzintensität als Maß der entstandenen Amplifikate gegenüber der durchlaufenen Zykluszahl darstellen.

Quantifizierung der Real-Time-PCR

Die in dieser Arbeit verwendete Quantifizierung erfolgte durch Normierung der Expression der Zielgene FLAP und 5-LO auf das nicht regulierte Referenzgen NIP-30. Hierbei wurde zunächst mit Hilfe der Rotor-Gene®Q Series-Auswertungssoftware der Ct-Wert (cycle threshold) als Punkt der PCR-Kurven, an dem das Fluoreszenzsignal des SYBR®Green erstmalig über das mittels Non-Template-Control ermittelte Hintergrundsignal ansteigt, bestimmt. Dieser Ct-Wert beschreibt die Zykluszahl zum Beginn der exponentiellen Phase der DNA-Amplifikation, welche jedoch ab einer bestimmten Zykluszahl aufgrund abnehmender Enzymaktivität sowie des verminderten Substratangebots in eine Plateauphase übergeht. Daher sind nur in dieser exponentiellen Phase optimale Reaktionsbedingungen für die Komponenten des in Tabelle 4.16 dargestellten Reaktionsansatzes geschaffen und es besteht eine lineare, indirekt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der Ausgangs-cDNA-Menge und dem Ct-Wert. Die Darstellung

der eingesetzten cDNA-Menge in einer logarithmischen Funktion gegenüber dem zugehörigen Ct-Wert ermöglichte für die zuvor angefertigten Verdünnungsreihen mit bekannten cDNA-Ausgangskonzentrationen die Erstellung von Standardkurven für jeden Primer. Der Anstieg m dieser Standardkurven diene hierbei entsprechend der Formel 2

$$E = 10^{-1/m} - 1 \quad \text{Formel 2}$$

zur Beurteilung der Effizienz (E) der abgelaufenen PCR-Reaktion, wobei anhand dieser Gleichung deutlich wird, dass eine Steigung von $m = -3,32$ einer 100%igen Effizienz - also einer Verdopplung der cDNA pro Zyklus - entspricht.

Zur Quantifizierung des relativen Expressionsunterschiedes der Zielgene zweier PCR-Produkte, wurde zunächst zur Normierung der Effizienzen die jeweils zweifach bestimmten Ct-Werte des Referenzgens (NIP-30) von denen der Zielgene (5-LO bzw. FLAP) entsprechend der Formel 3 abgezogen und somit der ΔCt -Wert gebildet.

$$\Delta Ct = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{Referenzgen}) \quad \text{Formel 3}$$

Anschließend wurde, wie in Formel 4 dargestellt,

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{PCR-Produkte II}) - \Delta Ct(\text{PCR-Produkte I}) \quad \text{Formel 4}$$

die Differenz $\Delta\Delta Ct$ der normierten ΔCt -Werte von den PCR-Produkten II (stimulierte HL-60eos-Zellen zur Beurteilung der Expressionssteigerung infolge der DMSO-Behandlung bzw. BJ-Zellen zur Analyse der cDNA-Expression der potentiellen Negativzelllinie) und den PCR-Produkten I der unbehandelten Kontrollproben (nicht stimulierte HL-60eos-Zellen) gebildet.

Die nachfolgende Bestimmung des relativen Expressionsunterschieds des Zielgens (5-LO bzw. FLAP) der PCR-Produkte I und II (= Ratio) normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf die Standard-cDNA ergibt sich dann aus der Formel 5

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad \text{Formel 5}$$

und ermöglicht somit Aussagen bezüglich der n -fachen Expression des Zielgens in den untersuchten Proben.

So konnten die relativen Expressionsunterschiede des Zielgens sowohl zwischen den untersuchten Zelllinien sowie zwischen den stimulierten und unstimulierten HL-60eos-Zellen ermittelt werden wobei die Expression der als Positivzelllinie angenommenen unstimulierten HL-60eos-Zellen stets als 100 % definiert wurde und somit als Referenz diente.

4.2.8.1.4 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Verifizierung der Spezifität der mittels quantitativer Real-Time-PCR amplifizierten Produkte erfolgte nach der ersten Beurteilung bei der Schmelzkurvenanalyse die Darstellung und Identifizierung der Produkte mittels gelelektrophoretischer Auftrennung in einem Agarose-Gel. Zur Durchführung wurde eine 1,5%ige (w/v) Agaroselösung in 1 : 2 mit A. dest. verdünntem TAE-Puffer (siehe Tabelle 4.4) hergestellt und nach Zugabe von Ethidiumbromid (1 : 20000) in die entsprechende Gelkammer gegossen. Nach 20 - 30 minütigem Auspolymerisieren konnte das Gel in die Elektrophoresekammer gehängt und mit 1 : 2 in A. dest. verdünntem TAE-Puffer vollständig bedeckt werden. Die Zugabe von 5 µl Ladepuffer (Orange G) zu den 20 µl PCR-Reaktionslösungen erfolgte unmittelbar vor dem Auftragen der 25 µl Probenlösung sowie 7 µl der als Größenstandard mitgeführten 50 bp DNA-Leiter in die Taschen des Agarosegels. Das Anlegen einer Spannung von 130 V für 45 min bewirkte die Bewegung der negativ geladenen DNA-Produkte zur Anode, wobei sich diese aufgrund von Wanderungsgeschwindigkeitsunterschieden in Abhängigkeit der Molekülgröße in den Fäden aus Agarosepolymeren auftrennten. Die Visualisierung der DNA-Banden im Gel erfolgte mittels UV-Imager, da das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid im UV-Bereich fluoresziert und somit die Detektion der PCR-Produkte ermöglichte.

4.2.8.2 Expressionsnachweis auf Proteinebene

Der Expressionsnachweis von 5-LO und FLAP auf Proteinebene in den verwendeten HL-60eos- bzw. BJ-Zellen erfolgte zur Beurteilung dieser Zelllinien hinsichtlich ihrer Qualifikation zum Einsatz als Positiv- bzw. Negativzelllinien der nachfolgenden *in vitro* Versuche. Bezüglich dieser Fragestellung wurde sowohl die Methode der SDS-PAGE mit nachfolgendem Western Blot und Immunfärbung durchgeführt sowie das Prinzip der Durchflusszytometrie angewandt. Dem Nachweis mittels SDS-PAGE gingen hierbei aufgrund der unterschiedlichen Lokalisationen der Targetproteine zwei verschiedene Methoden zur Isolation der Proteine aus den Zellpellets sowie die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA (Bicinchonin-Säure)-Test voraus.

4.2.8.2.1 Proteinisolation mittels RIPA-Lysepuffer

Bei der Proteinisolation mittels **RadioImmunoPräzipitationsAssay**-Puffer (siehe Tabelle 4.4) wurden die Zellpellets zunächst mit einem mit Protease-Inhibitor-Lösung (siehe Tabelle 4.4) im Verhältnis 1 : 7 versetzten RIPA-Puffer resuspendiert. Die Homogenisierung der Zellsuspension erfolgte durch Behandlung dieser im Ultraschallbad (60/120 W, 35 kHz) für 1 min und anschließender Lagerung auf Eis für 30 s. Nach 3maliger Wiederholung dieser

Sonifikation wurde die Probe für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (30 min, 16000 x g, 4 °C) um die vorwiegend zytosolischen Proteine von Zelltrümmern und –kernen zu separieren. Die nun im Überstand enthaltenen Proteine wurden abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

4.2.8.2.2 Detergentienbasierte Membranproteinisolation nach Vellonen et al.

Das Prinzip des leicht modifizierten Protokolls der Membranproteinextraktion nach ⁷⁶beruht auf einer Einlagerung der dem Lysepuffer zugesetzten Detergentien in die Biomembran, welche zu einer Stabilitätssteigerung der isolierten Proteine führt. Dabei erfolgte die Resuspendierung der Zellpellets mit Vellonen-Lysepuffer (siehe Tabelle 4.4) unter Zusatz einer Complete-Protease-Inhibitor-Lösung (siehe Tabelle 4.4) für 1 h auf Eis (4 °C). Die anschließende Zentrifugation (30 min, 10.000 x g) diente der Separierung der im Überstand befindlichen Proteine von den Zelltrümmern und -kernen des Sediments. Die Lagerung der Proteine erfolgte analog zur Proteinisolation mittels RIPA-Lysepuffer.

4.2.8.2.3 Gesamtproteinbestimmung mittels BCA-Test

Die Gesamtproteinbestimmung zur Quantifizierung der Isolationsprodukte aus Abschnitt 4.2.8.2.1 sowie 4.2.8.2.2 erfolgt mittels BCA-Test, da sich dieser durch eine hohe Unempfindlichkeit gegenüber vielen zur Lyse verwendeten Detergentien sowie eine geringe Störanfälligkeit bei hoher Sensitivität auszeichnet. Die quantitative photometrische Bestimmung von Proteinen mittels Bicinchonin-Säure (BCA) beruhte hierbei auf der Reduktion der im Komplex mit Proteinen befindlichen zweiwertigen Kupferionen zu Cu^+ (Biuret-Reaktion), welche nachfolgend mit BCA eine violette Komplexverbindung eingingen. Die Durchführung erfolgte im Dreifachansatz in einer 96-Well-Platte gegen einen zuvor hergestellten BSA- Kalibrationsstandard mit bekannter Proteinkonzentration.

Direkt vor der Verwendung wurde die BCA-Reaktionslösung aus den Reagenzien des QuantiProBCA Assay Kits entsprechend des Herstellerprotokolls (25 Teile „Lösung A“, 25 Teile „Lösung B“, 1 Teil „Lösung C“ siehe Tabelle 4.3) angesetzt und anschließend 100 µl dieses Gemisches pro Well eingesetzt. Nach Zugabe von 100 µl der BSA-Lösungen pro Well sowie der 1 : 200 verdünnten Proteinlösungen erfolgte die Inkubation der Platte (2 h, 37 °C), der sich nach 30 minütiger Abkühlzeit die photometrische Detektion mittels Mikroplattenreader bei 562 nm anschloss.

4.2.8.2.4 SDS-PAGE

Die isolierten und mittels BCA-Test quantifizierten Proteinlösungen wurden anschließend mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE gelelektrophoretisch entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt.

Die Gelherstellung erfolgte hierbei durch das Zusammenfügen der in Tabelle 4.18 aufgeführten Reagenzien, wobei das 4,3 %ige Sammelgel mit den Taschen erst nach Auspolymerisation des 10 %igen Trenngels aufgetragen wurde.

Tabelle 4.18 Auflistung der Einzelkomponenten (AA/BAA – Acrylamid/Bisacrylamid, APS - Ammoniumperoxidsulfat, TEMED - N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) des zur Proteinauftrennung mittels SDS-Page hergestellten 10 %igen Trenn- und 4,3 %igen Sammelgels mit Angabe deren eingesetzten Volumens.

Trenngel (10 %)		Sammelgel (4,3 %)	
Wasser	4,067 ml	Wasser	1,725 ml
30 % AA/BAA	3,333 ml	30 % AA/BAA	0,72 ml
4 x Trenngelpuffer	2,5 ml	2 x Sammelgelpuffer	2,5 ml
10 % APS	100 µl	10 % APS	50 µl
TEMED	10 µl	TEMED	5 µl

Unmittelbar vor Gebrauch der Gelelektrophorese kammer wurde diese mit Elektrophoresepuffer (siehe Tabelle 4.4) befüllt und die Taschen des Gels ausgespült.

Den jeweils 50 µg-Gesamtprotein enthaltenden Proteinlösungen wurde in Vorbereitung der Gelelektrophorese Bromphenolblau-haltiger SDS-Ladepuffer (siehe Tabelle 4.4) im Verhältnis 1 : 2 zugesetzt um ihnen durch Anlagerung von Sulfatgruppen eine negative Ladung zu verleihen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben im Thermoschüttler (5 min, 50 rpm, 95 °C) zur Denaturierung der Proteine. Nach Beladung des Gels mit den aus den Zellen isolierten Zellproben sowie 7 µl der Proteinleiter als Molekulargewichtsentsprechender Größenmarker wurde eine Spannung von 80 V für ca. 2 h angelegt bis die Lauffront des Bromphenolblaus das untere Ende des Gels erreicht hatte. Die angelegte Spannung bewirkte eine Migration der negativ geladenen Proben durch das elektrische Feld, wobei zunächst eine Aufkonzentrierung im Sammelgel und anschließend eine Auftrennung der Proteine aufgrund einer massenabhängigen Wanderungsgeschwindigkeit im Trenngel stattfand.

4.2.8.2.5 Western Blot und Immunfärbung

Direkt im Anschluss an die SDS-PAGE erfolgte ein Western Blot im Semi-Dry-Verfahren, zur Übertragung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Trägermembran. Hierbei wurden 6 befeuchtete Filterpapiere (siehe Tabelle 4.2), eine mit Methanol benetzte und für 10 min in Transferpuffer (siehe Tabelle 4.4) äquilibrierte PVDF-Membran sowie das Polyacrylamidgel in der Elektroblothingapparatur platziert. Das Anlegen eines senkrecht zum Gel ausgerichteten elektrischen Feldes (130 mA) über einen Zeitraum von 1,5 h bewirkte die Wanderung der Proteine zur PVDF-Membran sowie deren Bindung über hydrophobe Wechselwirkungen. Nach dem Transfer der Proteine auf die Trägermembran erfolgte eine Immunfärbung auf dem Taumelmischer bei 22 °C und 21 rpm, welche unter Ausnutzung der spezifischen Antikörper-Antigen-Bindung eine indirekte Identifizierung der Proteine ermöglichte. Alle für diese Immunfärbung verwendeten Puffer und Lösungen sind hierbei der Tabelle 4.4 zu entnehmen. Nach Inkubation der Blotmembran mit Blockpuffer II für 1 Stunde zur Sättigung der freien Proteinbindungsstellen, erfolgte ein einstündiger Inkubationsschritt mit in Verdünnungspuffer II im Verhältnis von 1 : 200 verdünntem Rabbit-anti-human-5-LO- bzw. Rabbit-anti-human-FLAP-Primärantikörper (siehe Tabelle 4.7). Die nachfolgenden Waschschrte mit Verdünnungspuffer II (3 x 5 min) dienten der Entfernung der schwächer haftenden, unspezifisch an die Membran gebundenen Primärantikörper. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem in Waschpuffer II 1 : 10.000 verdünnten HRP-konjugierten Goat-anti-rabbit-IgG-Sekundärantikörper (siehe Tabelle 4.7) für eine Stunde, welcher gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers gerichtet war. Nach weiteren Waschschrten (1 x 10 min mit Verdünnungspuffer II, 3 x 10 min mit Waschpuffer II) wurde die PVDF-Membran mit 500 µl Luminol und Peroxidasepufferlösung (Chemiluminescent HRP Substrat siehe Tabelle 4.3) für 5 min überspült. Durch die HRP katalysierte Oxidation von Luminol entstand Reaktionsenergie, welche in Form von Strahlung freigesetzt wurde. Dieses Lichtsignal konnte mittels Lumineszenzviewer detektiert werden und ermöglichte somit die indirekte Visualisierung der Proteinbanden auf der Membran.

4.2.8.2.6 Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung der HL-60eos- und BJ-Zellen hinsichtlich einer Expression von 5-LO und FLAP auf Proteinebene erfolgte weiterhin der Einsatz der Durchflusszytometrie, welche aufgrund der optischen Signale der vermessenen Zelllinien eine Analyse deren Eigenschaften ermöglichte. Hierzu wurden die verschiedenen Zelllinien mit den in Tabelle 4.19 zu entnehmenden, spezifischen gegen 5-LO und FLAP gerichteten Primärantikörpern inkubiert, welche von einem FITC-gekoppelten-Sekundärantikörper (siehe Tabelle 4.19) erkannt wurden, der somit ein für FITC charakteristisches Fluoreszenzsignal bei 519 nm erzeugte. Zur molekularen Charakterisierung der Zellen hinsichtlich ihrer Expression von 5-LO und FLAP mittels Durchflusszytometrie wurden 4 Ansätze pro Zelllinie entsprechend der Tabelle 4.19 hergestellt. Neben den Ansätzen 1 und 2 zum Nachweis der Proteinexpression wurde ein Ansatz mit nativen Zellen zur Beurteilung der Autofluoreszenz (= Negativkontrolle I) sowie ein ausschließlich mit FITC-Sekundärantikörper inkubierter Ansatz mitgeführt (= Negativkontrolle II), welcher der Beurteilung möglicher unspezifischer Bindungen dieses Antikörpers diene.

Für die HL-60eos-Zellen erfolgte zusätzlich zur Expressionsanalyse der Zellen die Beurteilung der Aufnahme und der Nachweis der Bindungsfähigkeit der DY-505-Anti-5-LO-Sonde durch die Durchführung eines 5. Ansatzes bei alleiniger Inkubation der Zellen mit dieser spezifischen Sonde.

Tabelle 4.19 Auflistung der zu den HL-60eos- und BJ-Zellen zugegebenen Komponenten für den Nachweis der Expression von 5-LO und FLAP auf Proteinebene (Ansatz 1-4) sowie zum Nachweis der Bindungsfähigkeit der DY-505-Anti-5-LO-Sonde (Ansatz 5) mittels Durchflusszytometrie. Aufgeführt sind hierbei die für die verschiedenen Nachweise und Kontrollen eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper mit Angabe deren Konzentrationen, Wirt und Epitop.

Ansatz	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Nachweis von
1	Rabbit-anti-human-5-LO (200 µg/ml)	Goat-anti-rabbit-IgG, FITC konjugiert (1 mg/ml)	5-LO-Expression
2	Rabbit-anti-human - FLAP (200 µg/ml)	Goat-anti-rabbit-IgG, FITC konjugiert (1 mg/ml)	FLAP-Expression
3	-	-	Autofluoreszenz der Zellen (= Negativkontrolle I)
4	-	Goat-anti-rabbit-IgG, FITC konjugiert (1 mg/ml)	Unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers (= Negativkontrolle II)
5	DY-505-Rabbit-anti-human-5-LO		Aufnahme und Bindungsfähigkeit der DY-505-Anti-5-LO-Sonde

Fixierung und Permeabilisierung der Zellen:

Zunächst erfolgte die Resuspendierung der Zellpellets in 100 µl sterilem PBS (siehe Tabelle 4.4), welchem sich die Fixierung der Zellen durch Inkubation mit in A. dest. verdünnter 2 %iger (w/v) Formaldehydlösung anschloss (15 min, 22 °C). Zum Beenden der Reaktion wurden weitere 800 µl PBS der Zellsuspension hinzugefügt und die Probe anschließend für 5 min zentrifugiert (200 x g, 4 °C). Das nachfolgende Waschen erfolgte mit 500 µl FACS-Puffer (siehe Tabelle 4.4) und anschließender Zentrifugation (5 min, 200 x g, 4 °C). Durch das dem FACS-Puffer zugesetzten Tween 20® (0,02 % v/v) wurde gleichzeitig die Permeabilisierung der Zellmembran zur Zugänglichkeit der intrazellulären Proteine gegenüber den verwendeten Antikörpern erreicht. Nach Wiederholung dieses Waschschruttes wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit 2 µg des entsprechenden Primärantikörpers (Tabelle 4.19) für eine Stunde auf Eis inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurden die Ansätze im Anschluss erneut 2 Waschgängen unterzogen. Es folgte wiederholt die Resuspendierung der Zellpellets in 100 µl FACS-Puffer, welcher sich die Inkubation mit 1 µg des FITC-konjugierten Sekundärantikörpers (siehe Tabelle 4.19) in Dunkelheit anschloss (1 h, 4 °C). Nach weiteren Waschgängen analog zu denen nach der Primärantikörper-Inkubation wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt.

Durchflusszytometrische Vermessung der Zellen:

Die Proben in den FACS-Röhrchen wurden nun nacheinander im FACSCalibur™-Durchflusszytometer vermessen und anhand ihrer optischen Eigenschaften klassifiziert. Dazu wurden die Zellen durch eine Kapillare angesaugt und die Fluoreszenz der einzelnen im Sensormodul einen Laserstrahl passierenden Zellen detektiert. Es konnte hierbei ein Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter), als Maß für das Volumen der Zelle, von dem Seitwärtsstreulicht (SSC = side scatter), zur Beurteilung der Größe, Struktur und Granularität der Zelle, unterschieden werden. Dies ermöglichte die Differenzierung verschiedener Zellpopulationen sowie von Zellen und Zelltrümmern. Die Aufnahme von zur Autofluoreszenz der Zellen zusätzlichen Fluoreszenzsignalen diente zum Einen der Detektion der durch FITC-gekoppelten-Sekundärantikörper markierten „positiven“ Zellen und lieferte somit indirekte Aussagen bezüglich der Bindung des Primärantikörpers welche Rückschlüsse auf die Expression von 5-LO und FLAP in den untersuchten Zellen zuließ. Andererseits ermöglichten die zusätzlichen Fluoreszenzsignale eine direkte Detektion der Sonden (Ansatz 5), welche der Analyse der Bindungsfähigkeit dieser als Primärantikörper zugegebenen Sonden diente.

Zur Messung dieses gegenüber der Autofluoreszenz der Zellen zusätzlichen FITC-Signals (Ansatz 1, 2, 4) bzw. des DY-505-Fluoreszenzlichtes (Ansatz 5) wurden die FL-1-Einstellungen

verwendet, bei denen der Laser bei 488 nm anregt und die Detektion des Fluoreszenzsignals mittels Bandpass-Filter bei 530 ± 30 nm erfolgt. Da eine Anregung der Zellen zur FACS-Analyse derzeit auf Laserlicht < 635 nm beschränkt ist und eine Detektion der im roten bzw. Nah-Infraroten-Bereich liegenden DY-682-Anti-5-LO- bzw. DY-782-Anti-FLAP-Sonden somit nicht möglich war, wurde auf ein Einsatz dieser Sonden als Primärantikörper verzichtet.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Cell Quest Software, indem zunächst für alle Zellen von jedem Ansatz die Streulichtsignale FSC und SSC gegeneinander als zweidimensionale Punktwolke in einem so genannten Streulicht-Dot-Blot aufgetragen wurden (siehe Abbildung 4.5). Dieses Punktwolkendiagramm ermöglicht – aufgrund der charakteristischen Größe, Struktur und Granularität von Zellen einer Population – durch Analyse von Größe und der Lage der einzelnen Punktwolken im Diagramm einen Aufschluss über Art und Menge der in der Probe befindlichen Zellen. Die anschließende Erstellung eines Histogramm-Plots erfolgte wie in Abbildung 4.5 dargestellt durch Auftragung der Zellzahl (y-Achse) gegenüber der mittleren Fluoreszenzintensität der Zellen in logarithmischer Einteilung (x-Achse). Zur Definition eines Bereichs C wurde in den Histogramm-Plot der unbehandelten Zellen nachfolgend ein Marker gesetzt, der sich im Vergleich zur Autofluoreszenz der Zellen durch höhere Fluoreszenzintensitäten auszeichnete und weniger als 3 % dieser nativen Zellen beinhaltete. Alle in dieser Region C befindlichen Zellen wurden somit als positiv hinsichtlich des jeweiligen Antikörpers definiert und als prozentualer Anteil an allen im Ansatz enthaltenen Zellen in % gated angegeben.

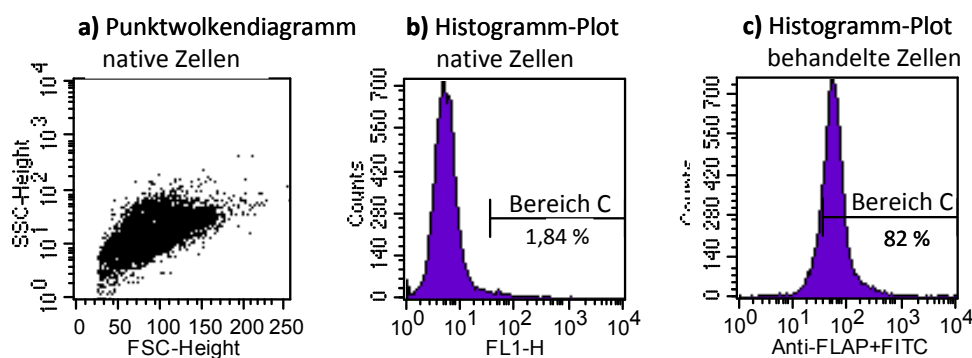


Abbildung 4.5 Exemplarische Darstellung der Auswertung durchflusszytometrischer Daten. (a) Charakteristisches Punktwolkendiagramm einer im Vorwärtstreulicht (FSC) sowie Seitwärtstreulicht (SSC) vermessenen unbehandelten HL-60eos-Zellpopulation. (b) Histogramm-Plot der zu (a) identischen Zellpopulation. Die Zellzahl (y-Achse) wurde hierbei gegenüber der logarithmischen Einteilung der mittleren Fluoreszenzintensität der Zellen (x-Achse) aufgetragen. Der Bereich C, zur Darstellung der hinsichtlich des Antikörpers positiven Zellen, beinhaltet die Autofluoreszenz übersteigende Fluoreszenzintensitäten und umfasst mit 1,84 % weniger als 3 % der nativen vitalen Zellen. (c) Histogramm-Plot der mit Primär- sowie FITC-konjugiertem Sekundärantikörper inkubierten HL-60eos-Zellen. Die Zellzahl (y-Achse) wurde hierbei gegenüber dem mittleren FITC-Signal der Zellen in logarithmischer Einteilung (x-Achse) aufgetragen. Der Bereich C des Plots (b) wurde übernommen und beinhaltet aufgrund der Anhebung des mittleren Fluoreszenzsignals nun zu 82 % bezüglich des eingesetzten Primärantikörpers positive Zellen. Diese durchflusszytometrisch analysierten Zellen sind somit zu 82 % positiv hinsichtlich der untersuchten Targetproteinexpression.

4.2.9 Mikroskopische Darstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden in HL-60eos- und BJ-Zellen

Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden *in vitro* wurden die fixierten und permeabilisierten HL-60eos- und BJ-Zellen mit den Sonden inkubiert und anschließend mittels Lichtmikroskopie dargestellt. Die mikroskopische Detektion der intrazellulär lokalisierten Sonden diente zudem einer ersten Analyse der Nachweisbarkeit des FRET-Effekts *in vitro*.

4.2.9.1 Herstellung von Poly-L-Lysin beschichteten Chamber SlidesTM

Zur besseren Haftung der Zellen an der Glasmatrix des Objektträgers, wurden Chamber SlidesTM zunächst unter sterilen Bedingungen mit dem Zelladhäsionsfaktor Poly-L-Lysin beschichtet. Hierzu wurde die Poly-L-Lysin-Gebrauchslösung (siehe Tabelle 4.4) in einer 1 ml Spritze aufgezogen und anschließend durch einen sterilen Filter ein Tropfen der Lösung in jedes Well der Chamber SlideTM gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 8 - 10 Minuten bei 37 °C wurden nicht gebundenen Anteile abgezogen und die Objektträger-Kammern für 24 Stunden zum Trocknen bei RT aufbewahrt. Nach sechs Waschschritten mit HBSS (siehe Tabelle 4.3) konnten jeweils 51750 HL-60eos- bzw. 8625 BJ-Zellen pro Well ausgesät und für 4 Stunden im Brutschrank kultiviert werden.

4.2.9.2 Immunozytologische Färbung der Zellen

Vor der immunozytologischen Färbung erfolgte zunächst die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Dazu wurden die Zellen nach Zugabe von 300 µl der Fixierlösung (siehe Tabelle 4.4) zu jedem Well für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Durchführung von zwei Waschschritten mit jeweils 300 µl HBSS wurden die Zellen mit Blockpuffer III (300 µl pro Well, 1 h, RT) unter leichtem Schwenken auf dem Taumelmischer inkubiert, wobei die Komponenten der eingesetzten Lösungen der Tabelle 4.4 zu entnehmen sind. Anschließend erfolgte, ebenfalls auf dem Taumelmischer, die Inkubation der Zellen mit 300 µl der in Blockpuffer III verdünnten 0,1 nmol Fluorophor enthaltenden spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden entsprechend der Tabelle 4.20 (1 h, RT, 21 rpm). Zur Beurteilung der Autofluoreszenz der Zellen wurde eine Negativkontrolle I (Ansatz 7) ohne Fluorophor-haltige Inkubationslösung und eine weitere 0,01 nmol DY-505 enthaltende Fluorophorlösung behandelte Negativkontrolle II (Ansatz 8) zur Darstellung unspezifischer Fluorophorbindungen mitgeführt. Nach Entfernung der Sondenlösung sowie dreimaligem Waschen der Zellen mit HBSS, wurden die Zellen mit dem Hoechst-Kernfarbstoff (0,5 µg/ml in PBS verdünnt) markiert. Die Hoechst-Kernfärbung erfolgte in völliger Dunkelheit, auf Eis für

10 Minuten. Im Anschluss an einen weiteren Waschschriff mit HBSS wurden die Kammern vorsichtig gelöst und nach Zugabe von einigen Tropfen Permafluor auf den Objektträger dieser mittels Deckgläschen luftdicht abgedeckt. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei 4 °C in Dunkelheit bis zur mikroskopischen Betrachtung.

Tabelle 4.20 Auflistung der den HL-60eos- und BJ-Zellen zugegebenen Komponenten zur mikroskopischen Darstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden *in vitro*. Aufgeführt sind hierbei die neben dem Hoechst-Kernfarbstoff für die verschiedenen Nachweise und Kontrollen eingesetzten 0,01 nmol Fluorophor enthaltenden Sonden- bzw. Farbstofflösungen.

Ansatz	Hoechst-Kernfarbstoff	Fluorophor-haltige Lösung	Nachweis von
1	+	-	Fluoreszenz der Kernfärbung
2	+	DY-505-Anti-5-LO	5-LO
3	+	DY-682-Anti-5-LO	5-LO
4	+	DY-782-Anti-FLAP	FLAP
5	+	DY-505-Anti-5-LO DY-782-Anti-FLAP	Kein FRET
6	+	DY-682-Anti-5-LO DY-782-Anti-FLAP	FRET-Effekt
7	-	-	Autofluoreszenz der Zellen (= Negativkontrolle I)
8	+	DY-505-Farbstofflösung	Unspezifischer Bindung des freien Farbstoffes (= Negativkontrolle II)

4.2.9.3 Detektion der spezifischen FLAP-bzw. 5-LO-Sonden mittels Lichtmikroskopie

Die mit den spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden inkubierten Zellen wurden mikroskopisch mit einem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 der Carl Zeiss MicroImaging GmbH untersucht.

Aufbau und Funktionsweise des Lichtmikroskops:

Dieses aufrechte Axioplan 2-Lichtmikroskop war mit einer 120-W Quecksilberdampf Kurzbogenlichtquelle X-Cite zur Anregung und einer monochromen CCD Kamera AxioCam MRm (1300 x 1030 Pixel) zur Bildaufnahme ausgestattet. Für die visuelle Untersuchung der Proben wurden verschiedene Objektive verwendet, wobei die digitalen Aufnahmen alle mit einem EC Plan Neofluar 40x/0,75 Ph2 Objektiv erfolgten, welches mit einer numerischen Apertur (NA) von 0,75 im roten Spektralbereich eine Auflösung von ca. 400 nm besitzt. Die Vergrößerung der Abbildung wurde so gewählt, dass in den Aufnahmen ein Pixel 360 nm, also etwa der Auflösung des Objektivs, entspricht. Durch die große NA und gute Transmission des Objektivs im sichtbaren und Nah-Infraroten Spektralbereich konnte

für die mikroskopischen Darstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden eine gute Sammeleffizienz der Fluoreszenz gewährleistet werden (siehe Abbildung 4.6).

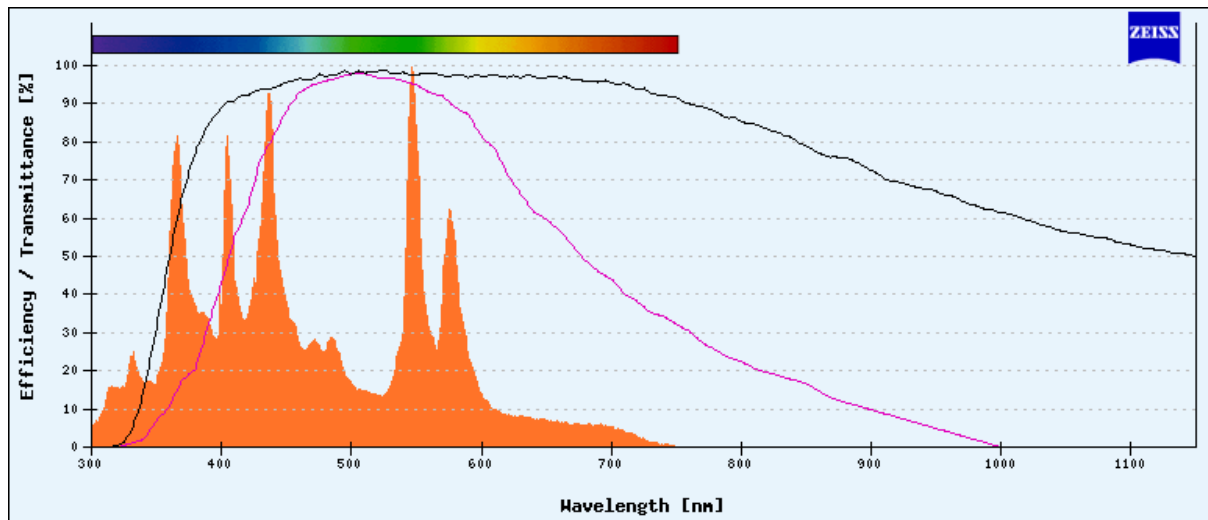


Abbildung 4.6 Spektrale Emission der Quecksilberdampf Kurzbogenlichtquelle X-Cite (orange), Darstellung der spektralen Transmission des EC Plan Neofluar 40x/0.75 Ph2 Objektives (schwarz) sowie der spektralen Empfindlichkeit der CCD Kamera AxioCam MRm (rosa). Quelle: <https://www.micro-shop.zeiss.com>

Trotz des deutlichen Abfalls der spektralen Emission der verwendeten Lichtquelle ($< 10\%$ der maximalen Emission ($E_{m_{\max}}$)) sowie der spektralen Empfindlichkeit der CCD Kamera ($< 50\%$ von $E_{m_{\max}}$) in Wellenlängenbereichen oberhalb von 700 nm, war eine Fluoreszenz-anregung bis 780 nm und eine Detektion bis 900 nm zu realisieren. Zusätzlich zur Fluoreszenzbildgebung konnte mit dem verwendeten EC Plan Neofluar 40x/0,75 Ph2 Objektiv auch eine Phasenkontrastbildgebung realisiert werden, welche vorrangig zur Lokalisation der Zellen eingesetzt wurde. Für die spektrale Selektion von Anregung und Emission der Fluorophore DY-505, DY-682, DY-782 sowie des Kernfarbstoffes Hoechst wurden aufeinander abgestimmte Fluoreszenzfiltersätze verwendet (siehe Tabelle 4.21).

Tabelle 4.21 Auflistung der zur Detektion verschiedener Fluorophore im Rahmen der mikroskopischen Darstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden *in vitro* verwendeten Filtersätze mit Angabe ihrer Hersteller (Chroma Technology Corporation, Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Die Fluorophore sind hierbei mit ihrem jeweiligen Absorptions- (A_{\max}) und Emissionsmaximums ($E_{m_{\max}}$) sowie den eingesetzten Anregungs- und Emissionsfiltern mit Angabe des Wellenlängenbereiches des selektiv passierenden Lichtes aufgeführt.

Farbstoff	Filtersatz	Hersteller	Anregungsfilter	Emissionsfilter
Hoechst (A_{\max} 365 nm, $E_{m_{\max}}$ 418 nm)	DAPI	Chroma	325 bis 375 nm	435 bis 485 nm
DY-505 (A_{\max} 505 nm, $E_{m_{\max}}$ 530 nm)	Set 09 (FITC)	Zeiss	450 bis 490 nm	515 nm Longpass
DY-682 (A_{\max} 690 nm, $E_{m_{\max}}$ 709 nm)	Set 32 (Cy5.5)	Zeiss	643 bis 688 nm	700 bis 750 nm
DY-782 (A_{\max} 784 nm, $E_{m_{\max}}$ 800 nm)	ICG	Chroma	750 bis 800 nm	823 bis 878 nm

Diese wurden entsprechend der schematischen Darstellung in Abbildung 4.7 in den Strahlengang der Lichtquelle des Mikroskops eingesetzt. Zur Untersuchung des FRET-Effekts bedarf es einer Kombination von Emissions- und Anregungsfiltern verschiedener Filtersätze, wobei zur Darstellung des FRET-Paares DY-682/DY-782 (Ansatz 6 siehe Tabelle 4.20) der Anregungsfilter aus Set 32 (siehe Tabelle 4.21) und der Emissionsfilter des ICG Filtersatzes (siehe Tabelle 4.21) zum Einsatz kamen. Da kein auf diese Filterkombination abgestimmter Strahlteiler zur Verfügung stand, wurden die Vermessungen dieser Proben (Ansatz 6 siehe Tabelle 4.20) unter Verwendung des jeweiligen Strahlteilers aus beiden Filtersätzen versucht. Hierbei stellte sich heraus, dass beide Strahlteiler ungeeignet sind, weil jeweils zuviel Anregungslicht in den Detektionsstrahlengang gelang und somit eine selektive Darstellung des von den Fluorophoren der Zellproben emittierten Lichtes nicht möglich war.

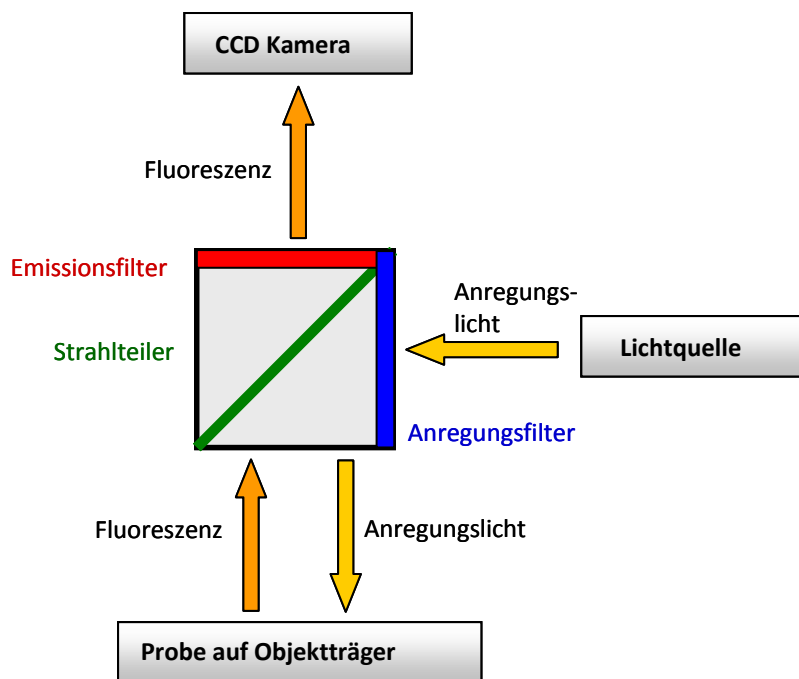


Abbildung 4.7 Schematische Darstellung der Anordnung der eingesetzten Fluoreszenzfilter in der Filtervorrichtung des Axioplan 2 Mikroskops. Die Anregung der Zellproben erfolgte mittels einer Quecksilberdampf Kurzbogenlichtquelle X-Cite, welcher ein Anregungsfilter zur Reduktion der spektralen Bandbreite des Lichtes vorgeschaltet war. Nach der Umleitung des Lichtes am Strahlteiler erfolgte die Anregung der auf einem Objektträger befindlichen Zellproben. Die von den Zellen emittierte Fluoreszenz konnte nach der Passage des Strahlteilers sowie des Emissionsfilters - zur Selektion des durchgehenden Lichtes - mittels einer CCD-Kamera detektiert werden.

Die Erstellung der Bildaufnahme sowie die Gesamtkontrolle des Mikroskops erfolgten mittels der zugehörigen Software AxioVision 4.6.

Mikroskopische Vermessung der Zellen:

Zur mikroskopischen Untersuchung der mit der DY-505-Farbstofflösung oder den FLAP- bzw. 5-LO-Sonden inkubierten Zellproben erfolgte zunächst die Lokalisierung der Zellen in den entsprechenden Wells auf dem Objektträger durch visuelle Betrachtung der Hoechstfluoreszenz. In Einzelfällen wurden die so bereits identifizierten Zellen durch Beobachtung der Zellprobe im Phasenkontrast verifiziert. Es folgte eine sequentielle Aufnahme der Zellen mit den jeweiligen Sonden-angepassten Filtersätzen (siehe Tabelle 4.21), wobei für alle Aufnahmen die Belichtungszeit konstant so gewählt wurde, dass für keine Sonde eine Überbelichtung des mikroskopischen Bildes auftrat (typisch: 2 - 7 ms). Zusätzlich wurden für alle Sonden mit schwacher bzw. nicht nachweisbarer Fluoreszenz eine Aufnahme mit einer maximalen Belichtungszeit von 10,7 ms durchgeführt. Auf eine weitere Verlängerung der Belichtungszeit jenseits dieses Wertes wurde aufgrund eines zunehmenden Dunkelrauschens des Detektors sowie einer vermehrten Streuphotonendetektion mit der Konsequenz einer abnehmenden signal-noise-ratio (SNR) verzichtet. Zur Verifizierung der Zuordnung des detektierten Signals zu einem Fluorophor wurden die Zellproben anschließend mit allen in der Tabelle 4.21 aufgeführten Filtersätzen bei maximaler Belichtungszeit (10,7 ms) vermessen.

Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen:

Für die nachfolgende Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen kam die Bildverarbeitungssoftware ImageJ zum Einsatz. Zur Darstellung der einzelnen Fluoreszenzsignale in den auf dem Objektträger fixierten Zellproben erfolgte zunächst die Fluorophor-spezifische Zuweisung von Farbkanälen, wobei dem Hoechst-Farbstoff blau, DY-505 cyan, DY-682 rot und DY-782 grün zugeordnet wurde. Nachfolgend wurde - zur Optimierung der Bildqualität - der Kontrast einzelner Aufnahmen durch Spreizung des Dynamikbereichs maximiert. Die abschließende Analyse der Zellproben wurde prinzipiell anhand der Darstellungen der isolierten Fluorophorsignale vorgenommen, wobei für ausgewählte Wells zur besseren Beurteilung der Lokalisation der Signale auch eine Überlagerung von Aufnahmen verschiedener Sonden derselben Probe erfolgte (*engl.*: Overlay). Eine räumliche Kalibrierung der lichtmikroskopischen Bilder der Zellen wurde durch Aufnahme einer standardisierten Probe Latex-Beads mit 4 µm Durchmesser realisiert.

4.2.10 Statistische Analyse

Die mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager ermittelten semiquantitativen Fluoreszenzintensitäten wurden - sofern nicht anders angegeben - als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Für die Analyse der Modell-Sonden hinsichtlich verschiedener Aufreinigungsmethoden sowie hinsichtlich ihrer Stabilität, welche in drei unabhängigen Versuchen erfolgten, wurde zur Prüfung der vorliegenden Daten auf statistische Signifikanz ein zweiseitiger Student's t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Für die Berechnung wurde der t-Test mittels Microsoft Excel verwendet und Werte $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

Für die jeweils in zweifacher technischer Wiederholung durchgeführten Expressionsanalysen mittels Real-time-PCR und FACS-Durchflusszytometrie wurden durch die Bildung des Pearson-Korrelationskoeffizienten mittels Microsoft Excel der Zusammenhang zwischen beiden Versuchsdurchführungen ermittelt und so untersucht, ob sich beobachtete Tendenzen im Wiederholungsversuch bestätigen konnten. Korrelationen $> 0,5$ wurden hierbei als guter statistisch begründbarer Zusammenhang betrachtet.

5 Ergebnisse

5.1 FRET-Eigenschaften der Fluorophore DY-505, DY-682, DY-782

Die Untersuchungen eines Energietransfers zwischen den Fluorophoren zum Nachweis des FRET-Effekts konnten die Fluorophore DY-505/DY-782 als negatives FRET-Paar (Kontroll-Paar) bestätigen, während für das Fluorophor-Paar DY-682/DY-782 ein FRET-Effekt nachgewiesen werden konnte.

Für das FRET-Paar (DY-682/DY-782) konnte man in den mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager entstandenen Aufnahmen nach Anregung des Donors und Messung der Gesamtemission beim Vergleich des Fluoreszenzsignals im Einzel- und gemeinsamen Spot (unter Konstanthaltung der Fluorophorkonzentration bei 179 pmol/cm²) schon optisch eine leichte Abnahme der Donoremission sowie eine deutliche Zunahme der Akzeptoremission ausmachen (siehe Abbildung 5.1 II). Diese Ergebnisse bestätigten sich bei der semiquantitativen Auswertung der Aufnahmen und sind in Abbildung 5.1 im Diagramm III dargestellt. Das DY-682-Signal verringerte sich in seiner Intensität von $2,7 \pm 0,6$ auf $1,7 \pm 0,05$ c/s (counts/sec), also auf etwa 63 % des Einzelspotsignals, während das Signal des DY-782-Fluorophors von $0,02 \pm 0,01$ auf $0,18 \text{ c/s} \pm 0,03$ auf 900 % des im Einzelspot gemessenen Signals anstieg. Mit der Abnahme des Donor- und der Zunahme des Akzeptorsignals im gemeinsamen Spot sind die Kriterien eines Energietransfers im Rahmen eines FRET-Paares erfüllt (siehe Abschnitt 2.3), womit DY-682/DY-782 als positives FRET-Paar angenommen werden kann.

Bei Anregung von DY-505, dem Donor des Kontroll-Paares, unter zur Messung des FRET-Paares identischen Belichtungszeiten, und Aufnahme der Akzeptoremission (DY-782) mit der in Tabelle 4.12 aufgeführten Filterkombination ließ sich kein Fluoreszenzsignal detektieren, weswegen im entsprechenden Fluoreszenzbild kein Dot zu erkennen ist. Bei der selektiven Darstellung der DY-505- bzw. DY-782-Emission unter den für die Fluorophore optimalen Aufnahmebedingungen (siehe Abbildung 5.1 II), konnte für beide Fluorophore kaum eine Änderung der Fluoreszenzintensitätsänderung zwischen dem Signal des Einzelspots und dem gemeinsamen Donor-Akzeptor-Spot (Fluorophorkonzentration jeweils 179 pmol/cm²) beobachtet werden. Das Fluoreszenzsignal des DY-505 stieg nur geringfügig von $1,7 \pm 0,7$ auf $1,87 \pm 0,6$ c/s an (110 % des Einzelspotsignals), während für das DY-782-Signal eine leichte Verminderung von $0,39 \pm 0,03$ auf $0,3 \pm 0,03$ c/s (80 % des Einzelspotsignals) festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 5.1 III). Unter Berücksichtigung der entsprechenden

Fehlerbalken in Abbildung 5.1 III kann von einer Konstanz der Fluoreszenzsignale von DY-505 und DY-782 in den untersuchten Spots ausgegangen werden, womit sich dieses Fluorophorpaar als negativ hinsichtlich des FRET-Effekts bestätigt.

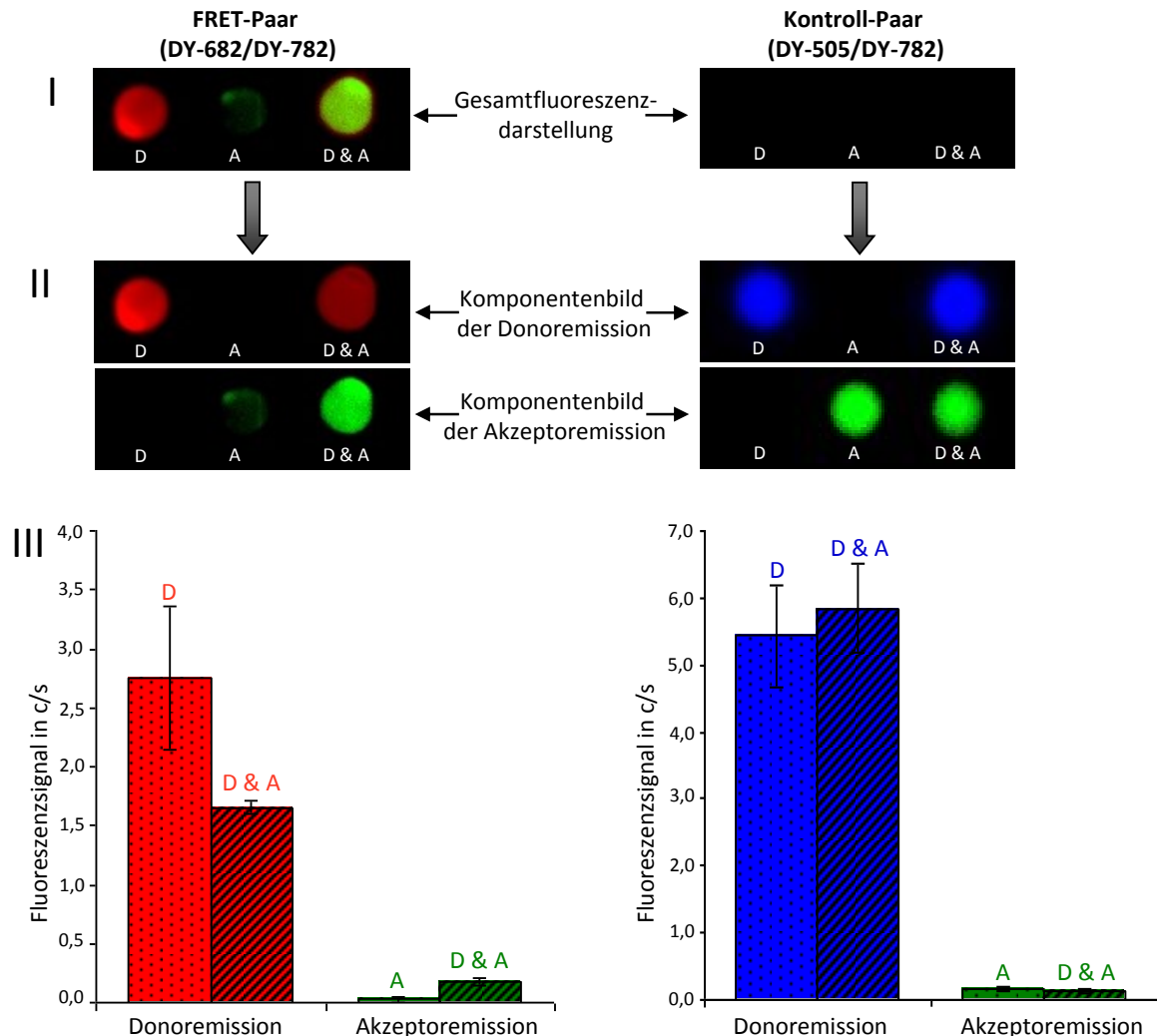


Abbildung 5.1 Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Fluorophore auf PVDF-Membranen zur Bestätigung der Fluorophore DY-682/DY-782 als positives FRET-Paar und das Kontroll-Paar DY-505/DY-782 als negativ hinsichtlich eines FRET-Effekts. Dargestellt sind die verschiedenen Schritte der Signalverarbeitung der mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager generierten multispektralen Aufnahmen, wobei die Detektion der Fluoreszenzsignale bei einer konstanten Belichtungszeit von 13 ms erfolgte. I Gesamtdarstellung der detektierten Fluoreszenzsignale nach Zuweisung der in Abschnitt 4.2.5.2 definierten Farben (DY-505 blau, DY-682 rot, DY-782 grün) und unter Verwendung der „Red“-Filterkombination für das FRET-Paar und dem Blue-Anregungs- und Red-Emissions-Filter für das Kontroll-Paar (siehe Tabelle 4.12). II Isolierte Darstellung der Donor- und Akzeptorsignale, durch Separation der Einzelfarbstoffe aus der Gesamtfluoreszenzdarstellung anhand ihrer Spektren (FRET-Paar). Für das Kontroll-Paar erfolgte zum Nachweis der einzelnen Fluorophore eine Vermessung der Membran unter den für die Farbstoffe DY-505 bzw. DY-782 optimalen Aufnahmebedingungen (DY-505 „Blue“-Filterkombination, DY-782 „Red“-Filterkombination). Diagramm III stellt die Fluoreszenzsignale in counts/sec (c/s) der zur semiquantitativen Analyse in die Aufnahmen II gelegten ROI's (Fluorophorkonzentration jeweils 179 pmol/cm²) sowie deren Standardfehler graphisch dar, wobei die Zuweisung der Diagrammfarben analog zu denen der MaestroTM-Aufnahmen erfolgte. Die Ergebnisse wurden in einem Wiederholungsversuch bestätigt, dessen Daten hier nicht dargestellt sind.

5.2 Analyse der Modell-Sonden

5.2.1 Optimierung des Kopplungsverhältnisses

Die Analyse des optimalen Kopplungsverhältnisses zwischen IgG und Fluorophor zeigte für alle Modell-Sonden eine Minimierung des Quenchingeffekts bei einem Stoffmengenverhältnis von 6 : 1 zwischen Fluorophor und IgG, wobei lediglich die Ergebnisse der DY-682- Versuche repräsentativ für alle Farbstoffe aufgeführt werden.

In den spektrophotometrisch generierten Absorptionsspektren (siehe Abbildung 5.2) kann man sowohl bei dem Verhältnis von 3 : 1 (a) als auch 12 : 1 (c) neben dem eigentlichen Fluorophorpeak bei 682 nm einen weiteren um einige nm in den UV-Bereich verschobenen Peak erkennen. Dieser Peak signalisiert die Ausbildung von H-Dimeren zwischen den Fluorophoren der Lösung und somit eine Fluoreszenzsignalauslöschung im Rahmen von Quenching-Prozessen. Lediglich bei den Sonden mit einem Stoffmengenverhältnis von 6 : 1 ist dieser zusätzliche Peak nicht zu erkennen und das ermittelte Spektrum ist dem Absorptionsspektrum des Herstellers Dyomics GmbH hinsichtlich des Fluorophorpeaks nahezu identisch. Die bezüglich der Analyse des optimalen Kopplungsverhältnisses ermittelten Ergebnisse der Modell-Sonden DY-505-Anti-IgG und DY-782-Anti-IgG stellen sich analog zu den hier aufgeführten Ergebnissen der DY-682-Anti-IgG-Sonden dar. Daher konnte das Kopplungsverhältnis von 6 : 1 zur Herstellung der Sondenlösungen als günstig hinsichtlich der Reduktion des Quenchingeffekts herausgestellt werden.

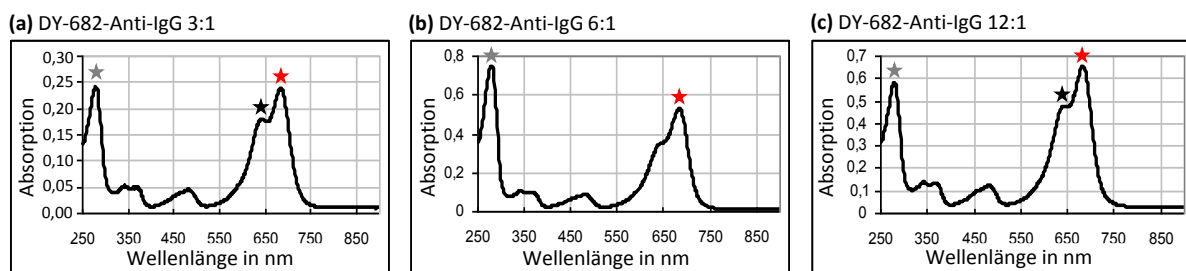


Abbildung 5.2 Repräsentative Absorptionsspektren von DY-682-Anti-IgG-Modell-Sondenlösungen in den Stoffmengenverhältnissen 3 : 1 (a), 6 : 1 (b) und 12 : 1 (c) zwischen DY-682 und dem Antikörper zur Analyse des Quenchingeffekts. Der bei 280 nm befindliche Peak (grauer Stern) steht hierbei für den Antikörper als Protein, während der Peak bei 682 nm (roter Stern) dem DY-682-Fluorophor zuzuordnen ist. Der mit einem schwarzen Stern versehene Peak in den Spektren (a) und (c) ist dem Fluorophorpeak um einige nm vorgelagert und kennzeichnet die H-Dimer-Bildung der Fluorophore im Rahmen eines Quenchingeffekts. Die Versuche wurden für alle Sonden in einer Einfachbestimmung durchgeführt.

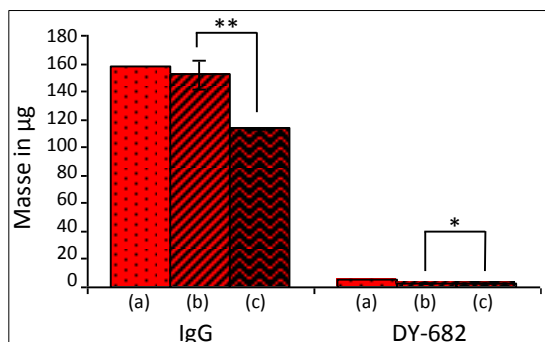
5.2.2 Optimierung der Aufreinigungsmethoden

Zur Ermittlung einer optimalen Aufreinigungsmethode der Modell-Sonden wurden für das Verfahren der Ultrafiltration gegenüber der Größenausschlusschromatografie insgesamt signifikant geringere absolute Verluste an IgG ($p < 0,01$) sowie eine signifikant höhere Aufkonzentrierung der finalen Sondenlösungen festgestellt ($p < 0,001$).

Man erkennt in Abbildung 5.3 (I), dass bei dem Verfahren der Ultrafiltration geringfügige IgG-Verluste von 7 μg auftraten, was einem Anteil von 4 % gegenüber der IgG-Ausgangsmasse von 159 μg in der Sondenlösung vor Aufreinigung entspricht. Die Verluste mittels Sephadex-Chromatografiesäule betrugen hingegen 45 μg , so dass lediglich 72 % des eingesetzten IgG's nach der Aufreinigung noch zur Verfügung standen. Die Dezymierung des zur Kopplung im Überschuss zugegebenen Fluorophors verhielt sich für beide Aufreinigungsmethoden ähnlich, wobei auch hier der zu verzeichnende prozentualer Verlust von DY-682 gegenüber der eingesetzten Menge von 5,05 μg mittels Ultrafiltration mit 39 % geringfügig kleiner ist als mittels Sephadex-Säule (49 %).

Weiterhin konnten signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen den beschriebenen Verfahren bezüglich der Konzentration von IgG und DY-682 in den aufgereinigten Sonden gegenüber der Ausgangskonzentration von 0,5 μM IgG und 2,7 μM DY-682 festgestellt werden (siehe Abbildung 5.3 II). So fand bei der Ultrafiltration eine Volumenabnahme verbunden mit einer Konzentrierung der Probe auf 1,0 μM IgG (200 %) und 3,2 μM DY-682 (118 %) statt, während bei der Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatografie eine Volumenzunahme sowie eine Verdünnung der Sondenlösung auf 0,3 μM IgG (60 %) und 1,0 μM DY-682 (37 %) festgestellt werden konnte.

I Massenänderung von IgG bzw. DY-682 unter Aufreinigung der Modell-Sondenlösung



II Konzentrationsänderung von IgG bzw. DY-682 unter Aufreinigung der Modell-Sondenlösung

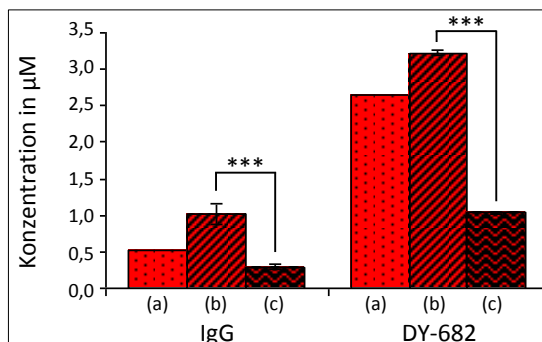


Abbildung 5.3 Vergleich der Aufreinigungstechniken Ultrafiltration (b) und Größenausschlusschromatografie (c) bezüglich der nach Anwendung des Verfahrens in den Sondenlösungen spektrophotometrisch ermittelten Massen (I) und Konzentration (II) von IgG und DY-682 gegenüber der Ausgangslösung vor dem Trennvorgang (a). Dargestellt ist der jeweilige Absolutwert der Sondenlösung vor Auftrennung bzw. der Mittelwert der aufgereinigten Probenansätze (Dreifachbestimmung der Werte) mit deren entsprechenden Standardfehler. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.2.3 Ermittlung des molaren Detektionslimits

Die Analyse des molaren Detektionslimits ergab eine zur Darstellung der Sonden auf Membranen mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager benötigte Mindeststoffmenge von etwa 0,0025 nmol Fluorophor pro Spot (entspricht 12,7 pmol/cm²) und eine hinsichtlich eines hohen Fluoreszenzsignals bei geringem Materialaufwand optimale Stoffmenge von 0,01 nmol/Spot (entspricht 52 pmol/cm²). Dabei konnte wie in Abbildung 5.4 ersichtlich ein optisches Signal des Fluorophors erst ab einer Stoffmenge von 0,0025 nmol DY-682 in der aufgetragenen Sondenlösung mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager detektiert werden. Die anschließende quantitative Auswertung zeigte eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals mit steigender Stoffmenge des DY-682-Fluorophors bis zu 0,01 nmol. Eine weitere Erhöhung der Fluorophormenge führte zu keiner weiteren Signalintensitätssteigerung, sondern zu einem weitestgehend konstanten Signal um 3,1 c/s. Die - hier nicht aufgeführten - Daten der DY-505- und DY-782-Modell-Sonden bestätigen, in Analogie zu den Resultaten der DY-682-Modell-Sonden-Untersuchung, 0,0025 nmol Fluorophor pro Spot als molares Detektionslimit des MaestroTM-Imagers und den Fluorophorauftrag von 0,01 nmol/Spot als optimal bezüglich einer hohen Signalintensität bei geringem Materialaufwand.

I Fluoreszenz-Aufnahme einer Konzentrationsreihe der DY-682-Modell-Sonde



II Semiquantitative Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Konzentrationsreihe der DY682-Modell-Sonde

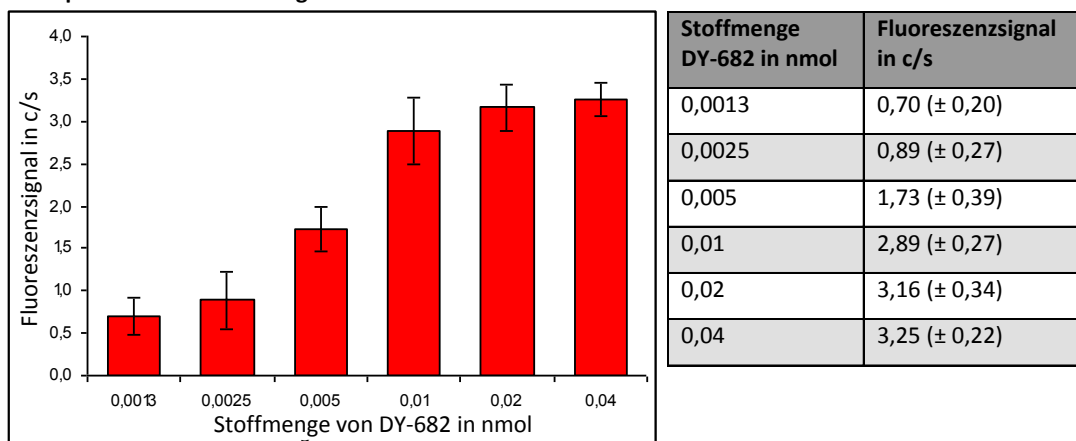


Abbildung 5.4 Repräsentative Darstellung des DY-682-Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Fluorophormenge in der Modell-Sondenlösung zur Ermittlung des molaren Detektionslimits auf einer Nitrocellulosemembran. I Mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager unter Verwendung der Red-Filterkombination (siehe Tabelle 4.12) generierte multispektrale Aufnahme der Konzentrationsreihe der DY-682-Modell-Sonde. Die semiquantitative Darstellung der verschiedenen Signalintensitäten der DY-682-IgG-Spots (6,5- 203,8 pmol/cm²) erfolgte unter Verwendung intensitätsabhängiger Falschfarben. II Fluoreszenzsignale der zur semiquantitativen Analyse in die Aufnahmen II gelegten ROI's sowie deren Standardfehler. Die Ergebnisse wurden für alle Modell-Sonden in einem Wiederholungsversuch bestätigt, dessen Daten hier nicht dargestellt sind.

5.2.4 Untersuchung der Sondenstabilität

Die Untersuchung der Stabilität der Modell-Sonden durch spektrophotometrische Bestimmung der mittleren Anzahl pro Antikörper gebundener Fluorophore (Dye-Protein-Ratio) zeigte über den analysierten Zeitraum von 8 Wochen eine signifikante Reduktion der Sondenstabilität ($p < 0,01$).

Abbildung 5.5 (I) zeigt im Rahmen der Stabilitätsuntersuchung der Dye-IgG-Bindung eine Abnahme der Dye-Protein-Ratios der DY-682-Anti-IgG-Sondenlösung im Verlauf der Zeit. Der deutliche Rückgang nach 4 Wochen von ursprünglich 2,9 auf 2,0 ging hierbei mit dem gleichzeitigen Auftreten von Fluorophor-Präzipitaten am Boden der Eppendorf-Gefäßen einher. Bis zum gewählten Endpunkt der Messzeit nach 8 Wochen konnte ein weiterer Abfall der Ratios auf insgesamt 1,7 beobachtet werden ($p < 0,01$). Der Rückgang der Dye-Protein-Ratios im Verlauf der Untersuchung zeigte somit eine Abnahme der Stabilität verbunden mit einem Zerfall der Sonde vor allem ab der 3. Woche nach Sondenherstellung.

Die Analyse der Stoffmengenveränderung von DY-682 alleine in PBS (siehe Abbildung 5.5 II) diente der Beurteilung der Stabilität des Farbstoffes und ergab über den gesamten Untersuchungszeitraum keinerlei signifikante Veränderungen ($p > 0,05$), weswegen die Fluorophorstabilität in den beobachteten 8 Wochen als konstant beschrieben werden kann.

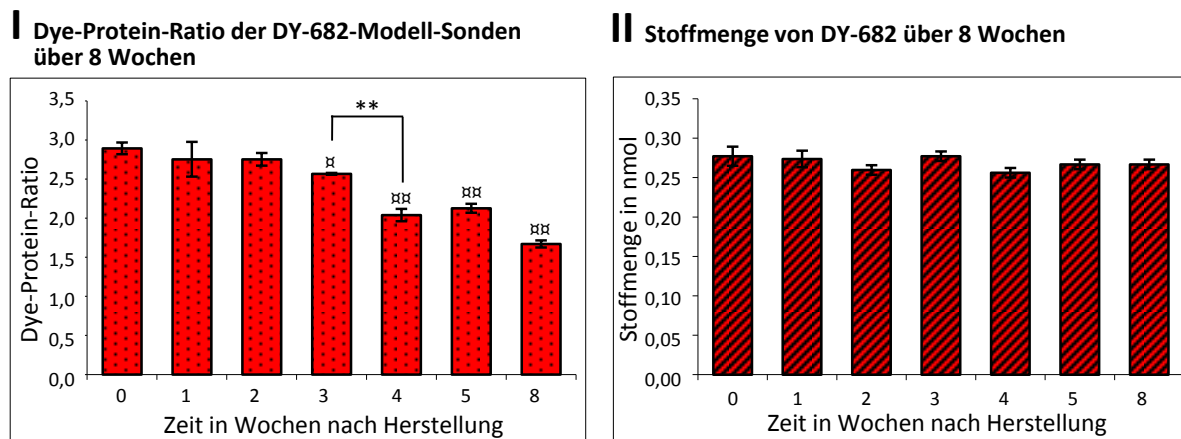


Abbildung 5.5 Untersuchung der Sonden- sowie Fluorophorstabilität durch spektrophotometrische Analyse der Dye-Protein-Ratios der DY-682-Anti-IgG-Sondenlösung (I) sowie der Stoffmenge der DY-682-PBS-Lösung (II) im Verlauf von 8 Wochen. Aufgetragen wurden die entsprechenden Mittelwerte der Probenansätze sowie deren Standardfehler. Die Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. ^{*} $p < 0,05$; ^{**} $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle unmittelbar nach Herstellung der Sonden (Woche 0). ****** $p < 0,01$

5.2.5 Nachweis der Bindungsfähigkeit der Modell-Sonden mittels Dot Blot

Durch die Analyse der Bindungsfähigkeit der hergestellten Modell-Sonden mittels Dot Blot konnte die Spezifität deren Antikörper-Antigen-Bindung nachgewiesen werden.

In Abbildung 5.6 sind die im MaestroTM-Fluoreszenz-Imager vermessenen, das Antigen (Rabbit-serum-IgG) enthaltenden und mit den DY-505- (a), DY-682- (b) sowie DY-782-(c) - Anti-rabbit-IgG-Modell-Sonden inkubierten PVDF-Membranen dargestellt. Da auf allen Membranen Fluoreszenzsignale der als Positivkontrolle aufgetragenen Modell-Sondenlösungen detektiert werden konnten, ist eine wesentliche Beeinträchtigung der Fluoreszenzeigenschaften der Fluorophore durch die Behandlung der Membran im Rahmen der Dot-Blot-Versuche auszuschließen. Neben dieser aufgetragenen Positivkontrolle waren für alle Sonden weiterhin Fluoreszenzsignale mit identischer Lokalisation zum aufgetragenen Antigen-Dot zu erkennen welche somit den Nachweis einer Bindung der Modell-Sonden an ihr Antigen lieferten. Keine der Membranen weist ein Hintergrundsignal auf, so dass unspezifische Anlagerungen der Sonde an die Membran nicht bzw. nicht in relevantem Maße stattfanden. Der Dot der Negativkontrolle Aqua dest. – zur zusätzlichen Beurteilung der unspezifischen Bindung des eingesetzten Primärantikörpers – wies ebenfalls keinerlei detektierbares Fluoreszenzsignal auf. Daher können die auf den Membranen detektierten Fluoreszenzen auf eine spezifische Bindung der Fluorophor-rabbit-anti-rabbit-IgG-Modell-Sonden an ihr Target-Protein Rabbit-serum-IgG zurückgeführt werden.

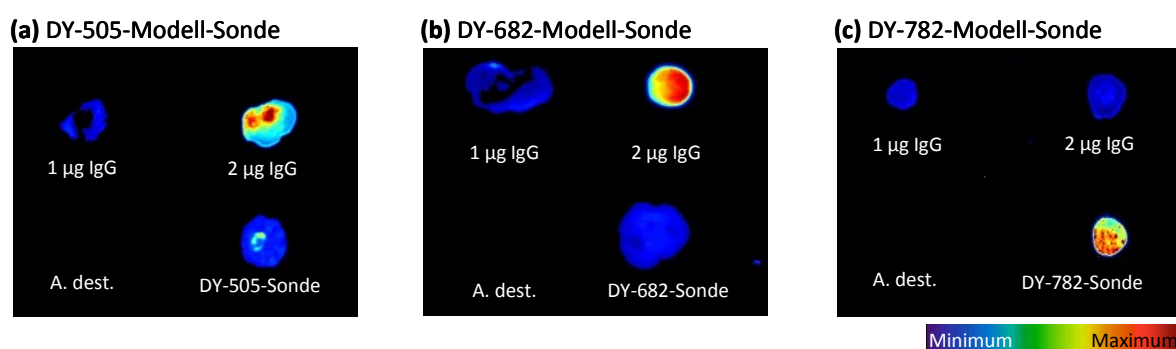


Abbildung 5.6 Nachweis der Bindungsfähigkeit der Antikörper-Antigen-Bindung von DY-505- (a), DY-682- (b) sowie DY-782- (c) -Anti-rabbit-IgG-Modell-Sonden an ihr entsprechendes Antigen (Rabbit-serum-IgG) mittels Dot-Blot auf PVDF-Membranen. Neben dem Auftragen von 1 sowie 2 µg des Target-Proteins IgG (= Antigen) (Spotfläche 2 - 6 mm²) wurden A. dest. zur Beurteilung unspezifischer Sondenbindungen als Negativkontrolle sowie die jeweilige Sonde als Positivkontrolle (Fluorophorkonzentrationen: a) 114,7 pmol/cm² b) 318,5 pmol/cm² c) 179 pmol/cm²) zum Nachweis des Erhalts der Fluoreszenzeigenschaften der Sonden unter der Membranbehandlung mitgeführt. Die multispektralen Aufnahmen wurden mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager unter Verwendung der in Tabelle 4.12 aufgeführten Filterkombinationen (DY-505 Blue-Filter, DY-682 Red-Filter, DY-782 NIR-Filter) erstellt und die Fluoreszenzstärken mit intensitätsabhängigen Falschfarben dargestellt. Die Ergebnisse wurden in einem Wiederholungsversuch bestätigt, dessen Daten hier nicht dargestellt sind.

5.3 Analyse der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden

5.3.1 Herstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden

Die spektrophotometrische Charakterisierung der gekoppelten DY-505- und DY-682-Anti-5-LO- sowie der DY-782-Anti-FLAP-Lösungen bestätigten die erfolgreiche Herstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden.

Repräsentative Absorptionsspektren der hergestellten DY-505- und DY-682-Anti-5-LO- sowie der DY-782-Anti-FLAP-Lösungen sind in Abbildung 5.7 dargestellt und zeigen einen für Proteine typischen Absorptionspeak bei 280 nm sowie einen Farbstoff-spezifischen Peak bei dem Absorptionsmaximum des jeweiligen Fluorophors. Die ermittelten Dye-Protein-Ratios verhielten sich mit 0,89 für die DY-505-Anti-5-LO-Sonde (a), 1,67 für die DY-682-Anti-5-LO-Sonde sowie 1,5 für die DY-782-Anti-FLAP-Sonde recht konstant, womit im Durchschnitt etwa 1,4 Fluorophormoleküle pro Antikörper gebunden waren.

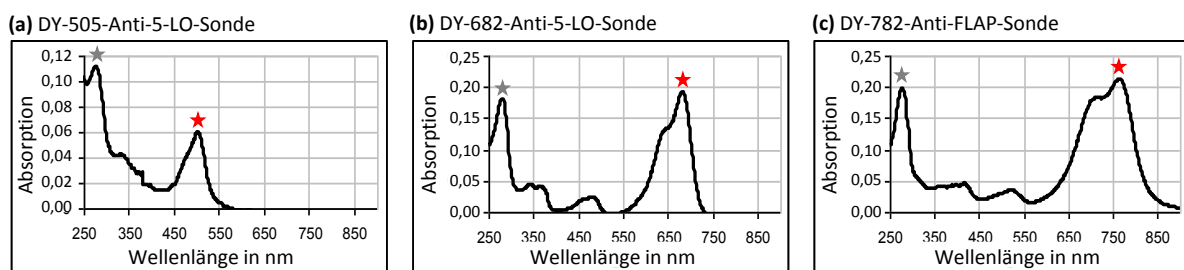


Abbildung 5.7 Absorptionsspektren der DY-505-Anti-5-LO- (a), der DY-682-Anti-5-LO- (b) sowie der DY-782-Anti-FLAP-Sondenlösungen (c) zur Analyse des Kopplungserfolgs. Die Herstellung der abgebildeten Sonden erfolgte hierbei in dem Stoffmengenverhältnis von 6 : 1 zwischen dem Fluorophor und dem IgG-Antikörper. Gekennzeichnet wurde einerseits der Proteinpeak der Spektren bei 280 nm (grauer Stern) welcher dem Antikörper zugeordnet wird sowie der jeweilige Fluorophorpeak (roter Stern). Die Ergebnisse wurden in einem Wiederholungsversuch bestätigt, dessen Daten hier nicht dargestellt sind.

5.3.2 Untersuchung der Fluoreszenzintensität der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden

Die Analyse der Fluoreszenzintensität der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden ergab im direkten Signalstärkenvergleich keine wesentlichen Unterschiede zu den fluorophormengen- und konzentrationsäquivalenten Farbstofflösungen.

Aus den hierfür mittels des MaestroTM-Fluoreszenz-Imager erstellten multispektralen Aufnahmen (siehe Abbildung 5.8 I) lässt sich erkennen, dass die Fluoreszenzeigenschaften der Fluorophore auch nach Kopplung an die spezifischen Antikörper erhalten blieben. Anhand der semiquantitativen Auswertung (siehe Abbildung 5.8 II) wird ersichtlich, dass keinerlei Minderung des Signals der spezifischen DY-505-Anti-5-LO-Sonde im Vergleich zur entsprechenden DY-505-Fluorophorlösung stattgefunden hat. Sowohl bei der Lösung der spezifischen DY-682-Anti-5-LO- als auch der DY-782-Anti-FLAP-Sonde ist eine geringfügige Signalreduktion um 28 % bzw. um 23 % im Vergleich zur Fluorophorlösung zu verzeichnen.

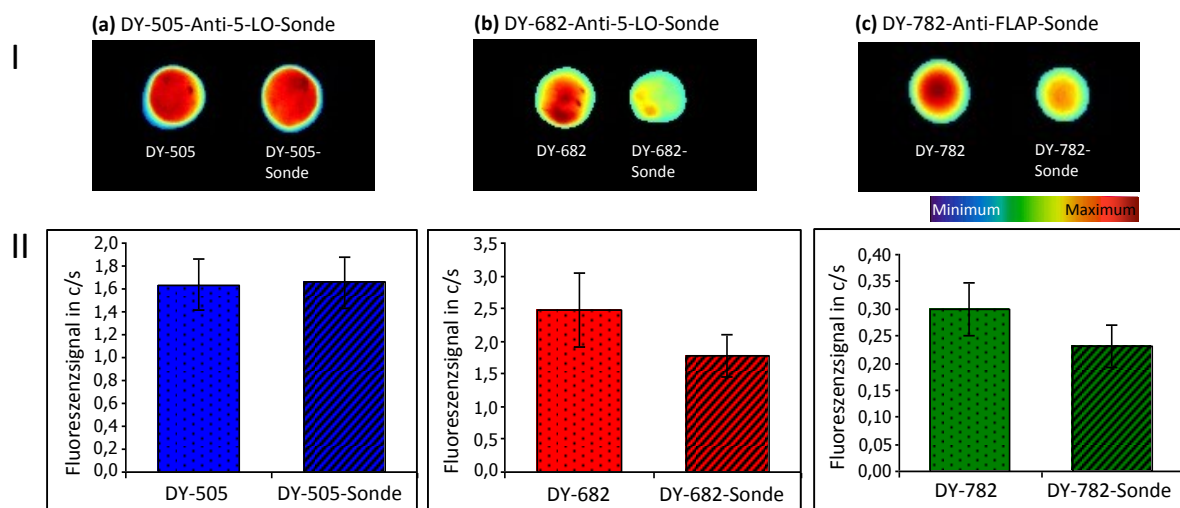


Abbildung 5.8 Repräsentative Analyse der Fluoreszenzintensität der spezifischen DY-505-Anti-5-LO- (a), DY-682-Anti-5-LO- (b) sowie der DY-782-Anti-FLAP-Sonden (c) im direkten Vergleich mit den entsprechenden fluorophormengen- und konzentrationsäquivalenten Farbstofflösungen. Der Auftrag der jeweiligen Probe erfolgte für alle Ansätze mit einer Fluorophormenge von 0,01 nmol auf PVDF-Membranen (Fluorophorkonzentration: 94,8 pmol/cm²). Die Erstellung der Aufnahmen (I) mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager erfolgte unter Verwendung der in Tabelle 4.12 aufgeführten Filterkombinationen (DY-505 Blue-Filter, DY-682 Red-Filter, DY-782 NIR-Filter) und unter Darstellung der Fluoreszenzstärken mit intensitätsabhängigen Falschfarben. II Mittelwerte der Fluoreszenzsignale der zur semiquantitativen Analyse in die Aufnahmen I gelegten ROI's (jeweils 854 - 933 Pixel) sowie deren Standardfehler. Die Ergebnisse wurden in einem Wiederholungsversuch bestätigt, dessen Daten hier nicht dargestellt sind.

5.3.3 FRET-Eigenschaften der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden

Die Untersuchungen eines Energietransfers zwischen den Fluorophoren der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden zum Nachweis des FRET-Effekts bestätigten die DY-505-Anti-5-LO- und die DY-782-Anti-FLAP-Sonde als negativ hinsichtlich eines Energietransfers (Kontroll-Sonden) während für die Sonden DY-682-Anti-5-LO und DY-782-Anti-FLAP (FRET-Sonden) ein FRET-Effekt nachgewiesen werden konnte.

In den mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager entstandenen multispektralen Aufnahmen der FRET-Sonden (DY-682-Anti-5-LO/DY-782-Anti-FLAP) (siehe Abbildung 5.9 I und II) zeigte sich trotz äquivalenten Fluorophorkonzentrationen von $94,8 \text{ pmol/cm}^2$ schon optisch eine Abnahme der Donor- und Zunahme der Akzeptorfluoreszenz beim direkten Vergleich der Signalstärken des Donor bzw. Akzeptors alleine (Einzelspotsignal) und in Anwesenheit des jeweilig anderen Fluorophors (gemeinsamer Spot). Auch in den dazugehörigen Diagrammen (siehe Abbildung 5.9 III) konnte diese Reduktion des Donorsignals von $2,2 \pm 0,43$ auf $1,39 \pm 0,16 \text{ c/s}$ sowie ein Akzeptorsignalanstieg von $0,06 \pm 0,01$ auf $0,11 \text{ c/s} \pm 0,02$ festgestellt werden, was für die DY-682-Donor-Sonde 63 % und für die DY-782-Akzeptor-Sonde 183 % des Einzelspotsignals entspricht. Mit dem Nachweis der Abnahme der Donorfluoreszenzintensität bei gleichzeitigem Anstieg des Akzeptorfluorophorsignals im gemeinsamen Spot sind die Kriterien eines Energietransfers im Rahmen eines FRET-Paares erfüllt (siehe Abschnitt 2.3). Somit konnte gezeigt werden, dass die FRET-Eigenschaften der DY-682/DY-782-Fluorophore auch nach Kopplung an IgG-Antikörper erhalten geblieben sind.

Bei Anregung von DY-505, dem Donor des Kontroll-Paares, unter zur Messung des FRET-Paares identischen Belichtungszeiten und Detektion der Akzeptoremision (DY-782) mit der in Tabelle 4.12 aufgeführten Filterkombination konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden, weswegen das entsprechende MaestroTM-Bild vollständig schwarz erscheint (siehe Abbildung 5.9 I). Die Einzeldarstellung der DY-505- bzw. DY-782-Emission durch Aufnahme der Membran mit den in Tabelle 4.12 verzeichneten Filtern (siehe Abbildung 5.9 II), ergab keine erhebliche Änderung der Signalintensität zwischen den separaten Spots und dem gemeinsamen Spot der Donor- und der Akzeptor-Sonde (Fluorophorkonzentration jeweils $94,8 \text{ pmol/cm}^2$). Das Fluoreszenzsignal des DY-505 zeigte eine geringfügige Abnahme von $1,88 \pm 0,4$ auf $1,67 \text{ c/s} \pm 0,09$ (89 % des Einzelspotsignals) und auch für das DY-782-Signal konnte eine Verminderung von $0,39 \pm 0,09$ auf $0,25 \pm 0,02 \text{ c/s}$ (64 % des Einzelspotsignals) festgestellt werden (siehe Abbildung 5.9 III). Diese Intensitätsänderungen sind jedoch unter Berücksichtigung der sich deutlich überlappenden Fehlerbalken als nicht relevant

einzuordnen. Somit konnte dieses Fluorophor-Paar auch nach kovalenter Bindung an die entsprechenden Antikörper als negativ bezüglich des FRET-Effekts bestätigt werden.

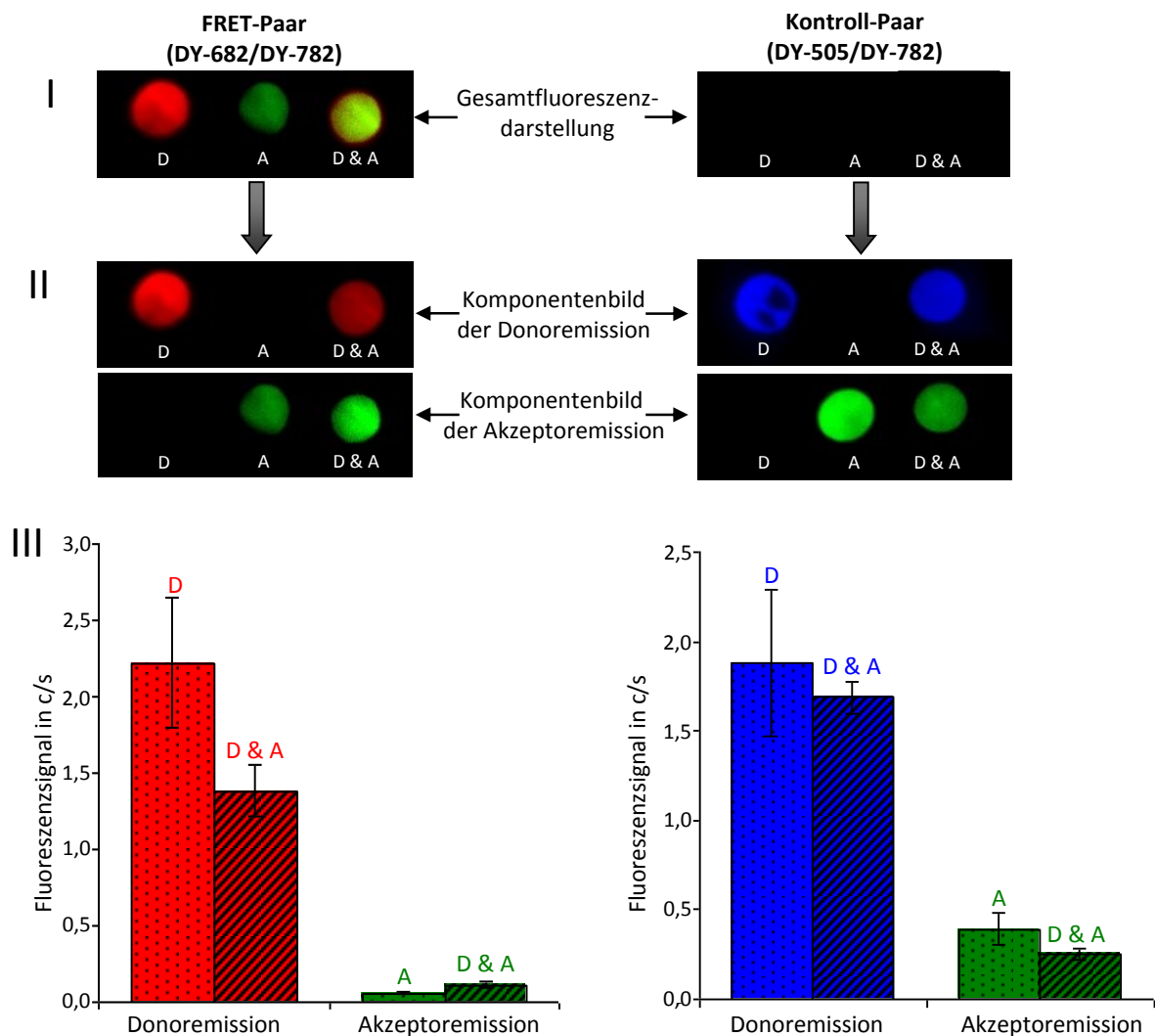


Abbildung 5.9 Fluoreszenzeigenschaften der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden auf PVDF-Membranen **izur Bestätigung der FRET-Sonden (DY-682-Anti-5-LO/DY-782-Anti-FLAP) als positiv hinsichtlich des FRET-Effekts und die DY-505-Anti-5-LO-/DY-782-Anti-FLAP-Sonden als Kontroll-Sonden-Paar.** Dargestellt sind die verschiedenen Schritte der Signalverarbeitung der mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager generierten multispektralen Aufnahmen, wobei die Detektion der Fluoreszenzsignale bei einer konstanten Belichtungszeit von 16 ms erfolgte. **I** Gesamtdarstellung der detektierten Fluoreszenzsignale unter Zuweisung der in Abschnitt 4.2.5.2 definierten Farben (DY-505 blau, DY-682 rot, DY-782 grün) unter Verwendung der Red-Filterkombination für das FRET-Paar und dem Blue-Anregungs- und Red-Emissions-Filter für das Kontroll-Paar (siehe Tabelle 4.12). **II** Isolierte Darstellung der Donor- und Akzeptorsignale, durch Separation der Einzelfarbstoffe aus der Gesamtfluoreszenzdarstellung anhand ihrer Spektren (FRET-Sonden-Paar). Für das Kontroll-Sonden-Paar erfolgte zum Nachweis der einzelnen Fluorophore eine Vermessung der Membran unter den für die Farbstoffe DY-505 bzw. DY-782 optimalen Aufnahmebedingungen (DY-505 Blue-Filterkombination, DY-782 Red-Filterkombination). Diagramm **III** stellt die Fluoreszenzsignale der zur semiquantitativen Analyse in die Aufnahmen **II** gelegten ROI's (Fluorophorkonzentration jeweils 94,8 pmol/cm²) sowie deren Standardfehler graphisch dar, wobei die Zuweisung der Diagrammfarben analog zu denen der MaestroTM-Aufnahmen erfolgte. Die Ergebnisse wurden in einem Wiederholungsversuch bestätigt, dessen Daten hier nicht dargestellt sind.

5.3.4 Nachweis der Bindungsfähigkeit der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden

Durch die Analyse der Bindungsfähigkeit der hergestellten spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden mittels Dot Blot konnte die Spezifität deren Antikörper-Antigen-Bindung aus technischen Gründen nicht nachgewiesen werden, da eine hinreichende Bindung der aufgetragenen Reinproteine an die Membran nicht möglich war.

In Abbildung 5.10 I sind die im MaestroTM-Fluoreszenz-Imager vermessenen das Antigen (5-LO- bzw. FLAP-Reinprotein) enthaltenden und mit den DY-505- bzw. 682-Anti-5-LO- und DY-782-Anti-FLAP-Sonden inkubierten PVDF-Membranen dargestellt. Diese zeigen für alle Sonden deutliche Fluoreszenzsignale der als Positivkontrolle zum Nachweis des Erhalts der Sondenfluoreszenz unter der Membranbehandlung aufgetragenen spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden. Somit konnte eine wesentliche Beeinträchtigung der Fluoreszenzeigenschaften der Fluorophore durch die Behandlung der Membran im Rahmen der Dot-Blot-Versuche ausgeschlossen werden. Neben diesen aufgetragenen Positivkontrollen sind jedoch keine weiteren Fluoreszenzsignale in Kolokalisation zum aufgetragenen Antigen-Dot sowie kein allgemeines Hintergrundrauschen der Membran detektierbar. Die nach Signalamplifikation infolge einer Inkubation mit dem HRP-konjugierten-Sekundärantikörper mittels Lumineszenzviewer angefertigten Aufnahmen (Abbildung 5.10 II) zeigen analog zu den multispektralen Aufnahmen (Abbildung 5.10 I) lediglich die fixierte Positivkontrolle. Somit konnten mittels der durchgeführten Dot-Blot-Versuche auch nach der Steigerung des optischen Signals der Sonden weder die Bindungsfähigkeit der hergestellten spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden an ihr entsprechendes Antigen noch unspezifische Anlagerungen der Sonden an die Membran nachgewiesen werden. Mittels der anschließend zum Nachweis der Bindungseffizienz der auf die PVDF-Membranen aufgetragenen 5-LO- bzw. FLAP-Reinproteine durchgeführten Ponceau-Rot-Färbung (Abbildung 5.10 III) konnten die Proteine auf keiner der Membranen sichtbar gemacht werden. Auch die Visualisierung der Proteine 5-LO und FLAP mittels Amidoschwarz-sowie Coomassie-Färbung (Abbildung 5.10 V und IV) fiel negativ aus. Mit Ausnahme der DY-505-Membran zum Nachweis der DY-505-Anti-5-LO-Bindung konnten auch mit keiner der aufgeführten Proteinfärbungen die in Abbildung 5.10 I und II bereits detektierten als Positivkontrollen aufgetragenen Sondenlösungen visualisiert werden. Lediglich bei der Proteinfärbung mittels SYPRO[®]-Ruby (Abbildung 5.10 VI) gelang der Nachweis der Reinproteine sowie der Positivkontrolle. Somit konnte durch die Bestätigung der Bindungseffizienz der Reinproteine auf der Membran mittels SYPRO[®]-Ruby-Proteinfärbung zumindest der prinzipielle Erfolg des Blot-Vorgangs nachgewiesen werden.

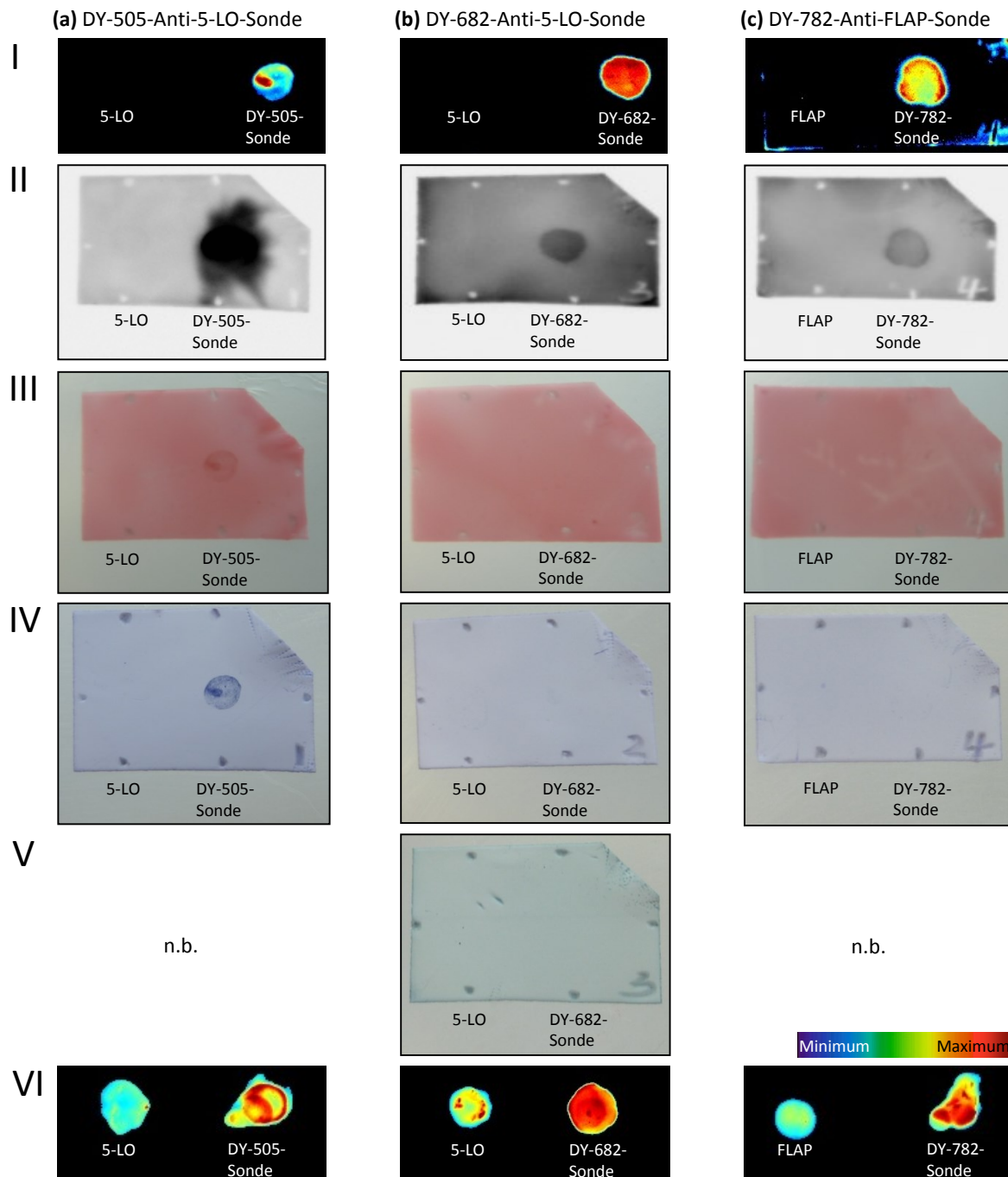


Abbildung 5.10 Nachweis der Bindungsfähigkeit der DY-505-Anti-5-LO- (a), DY-682-Anti-5-LO- (b) und DY-782-Anti-FLAP-Sonden (c) an ihr entsprechendes Antigen mittels Dot-Blot sowie anschließende Proteinfärbung zur Bestätigung der Bindungseffizienz der aufgetragenen Antigene an die PVDF-Membranen. Neben dem Auftragen von 1 µg des Sonden-spezifischen Reinproteins 5-LO bzw. FLAP (= Antigen) wurde die jeweilige Sonde als Positivkontrolle (Konzentrationen: (a) 318,5 pmol/cm²; (b) und (c) 179 pmol/cm²) zum Nachweis des Erhalts der Sondenfluoreszenz unter der Membranbehandlung mitgeführt. Die exemplarischen multisppektralen Aufnahmen der Dot-Blot-Membranen (I) wurden mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager unter Verwendung der in Tabelle 4.12 aufgeführten Filterkombinationen (DY-505 Blue-Filter, DY-682 Red-Filter, DY-782 NIR-Filter) erstellt und die Fluoreszenzstärken mit intensitätsabhängigen Falschfarben dargestellt. II Immunodetektion der mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern inkubierten Dot-Blot-Membranen. III, IV, V und VI Bestätigung der Bindungseffizienz der aufgetragenen Antigene mit Hilfe verschiedener Proteinfärbungen, wobei III das Ergebnis der Ponceau-Färbung, IV die Coomassie-Färbung und V die Färbung mittels Amidoschwarz darstellt. Die multispektrale Aufnahme der SYPORO[®]-Ruby-Färbung (VI) wurde mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager unter Verwendung der Green-Filter angefertigt und die Fluoreszenzintensitäten ebenfalls mittels Falschfarben dargestellt. Die Versuche I und II wurden in Dreifachbestimmung, III-VI in Einfachbestimmung durchgeführt.

Im Gegensatz zur Analyse der Bindungsfähigkeit der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden mittels Dot Blot konnte mittels FACS-Durchflusszytmetrie eine Bindung der DY-505-Anti-5-LO-Sonde in HL-60eos- und BJ-Zellen nachgewiesen werden. Die im Anschluss an die durchflusszytometrische Vermessung der Zellen erstellten Histogramm-Plots (siehe Abbildung 5.11) zeigten für die mit der DY-505-Anti-5-LO-Sonde inkubierten Zellen gegenüber der Autofluoreszenz der nativen Zellen zusätzliche Fluoreszenzsignale. 44 % der mit der spezifischen 5-LO-Sonde behandelten HL-60eos- und 35 % der BJ-Zellen weisen entsprechend der in die Histogramm-Plots gelegten Marker (Bereich C) diese im Vergleich zur Autofluoreszenz höheren Fluoreszenzintensitäten auf und können somit als positiv hinsichtlich der Bindung der eingesetzten DY-505-Anti-5-LO-Sonde identifiziert werden.

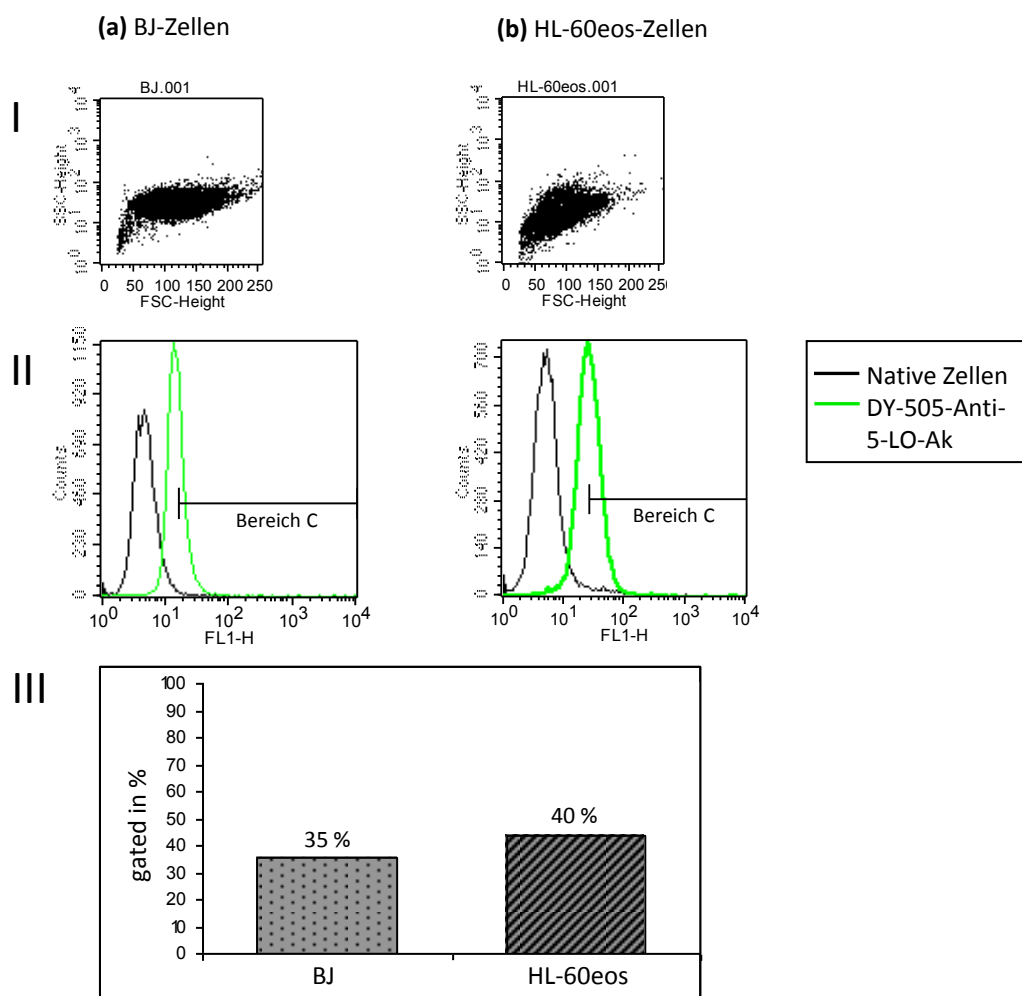


Abbildung 5.11 Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindungsfähigkeit der Antikörper-Antigen-Bindung der DY-505-Anti-5-LO-Sonde an ihr intrazelluläres Targetprotein 5-LO in BJ- (a) sowie in HL-60eos-Zellen (b). I Punktwolkendiagramme der im Vorwärtsstreulicht (FSC) sowie Seitwärtsstreulicht (SSC) vermessenen unbehandelten HL-60eos- bzw. BJ-Zellpopulationen. II Histogramm-Plots mit dem gemeinsamen Auftrag des Fluoreszenzsignals der unbehandelten Zellen (schwarz) sowie der mit DY-505-Anti-5-LO inkubierten Zellen (grün) in einem Diagramm als Overlay. Die Zellzahl (y-Achse) wurde hierbei gegenüber der logarithmischen Einteilung der mittleren Fluoreszenzintensität der Zellen (x-Achse) aufgetragen. Der Bereich C, zur Darstellung der hinsichtlich des Antikörpers positiven Zellen, wurde in den Histogramm-Plots gekennzeichnet und die in ihm enthaltenen Zellen als prozentualer Anteil bezogen auf die gesamten vitalen Zellen des entsprechenden Ansatzes im Diagramm III für die BJ-Zellen sowie die HL-60eos-Zellen abgebildet (Einfachbestimmung).

5.4 Expressionsnachweis von 5-LO und FLAP in HL-60eos- und BJ-Zellen

Die Untersuchung der unstimulierten und stimulierten HL-60eos- sowie BJ-Zellen auf eine Expression von 5-LO und FLAP erfolgte zur Entwicklung eines geeigneten Zellmodells für die *in vitro* Analyse der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden und zeigte eine Expression der Proteine in den HL-60eos-Zellen während die BJ-Zellen als Negativzelllinie bestätigt werden konnten.

5.4.1 Expressionsnachweis von 5-LO in HL-60eos- und BJ-Zellen

5.4.1.1 Expressionsnachweis von 5-LO auf mRNA-Ebene

Zur mittels quantitativer Real-Time-PCR durchgeführten 5-LO-Expressionsanalyse der HL-60eos sowie BJ-Zellen konnte in den BJ-Zellen keine Expression von 5-LO nachgewiesen werden, während die HL-60eos-Zellen eine stimulationsabhängige Expression von 5-LO zeigten.

Für die BJ-Zellen wurde gegenüber den als Referenz gewählten unstimulierten HL-60eos-Zellen eine relative Expression der 5-LO von 0 ermittelt (siehe Abbildung 5.12), da hier keine Amplifikation der Ausgangs-cDNA bei Zugabe der 5-LO-Primer detektierbar war. Die Schmelzkurvenanalyse (siehe Abbildung 5.13) sowie die Untersuchung der PCR-Produkte dieser Ansätze mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Abbildung 5.14) ergaben zu der Non-template-control identische Ergebnisse. Dies bestätigt, dass keinerlei spezifische oder relevante unspezifische PCR-Produkte gebildet wurden und die BJ-Zellen somit hinsichtlich einer 5-LO-Expression als negativ einzuordnen sind.

Die Stimulation der HL-60eos Zellen mittels DMSO bewirkte eine nach 4 Stunden leicht verminderte, nach 24 Stunden allerdings auf das etwa 9fache gesteigerte Expression von 5-LO gegenüber den unstimulierten HL-60eos-Zellen (siehe Abbildung 5.12).

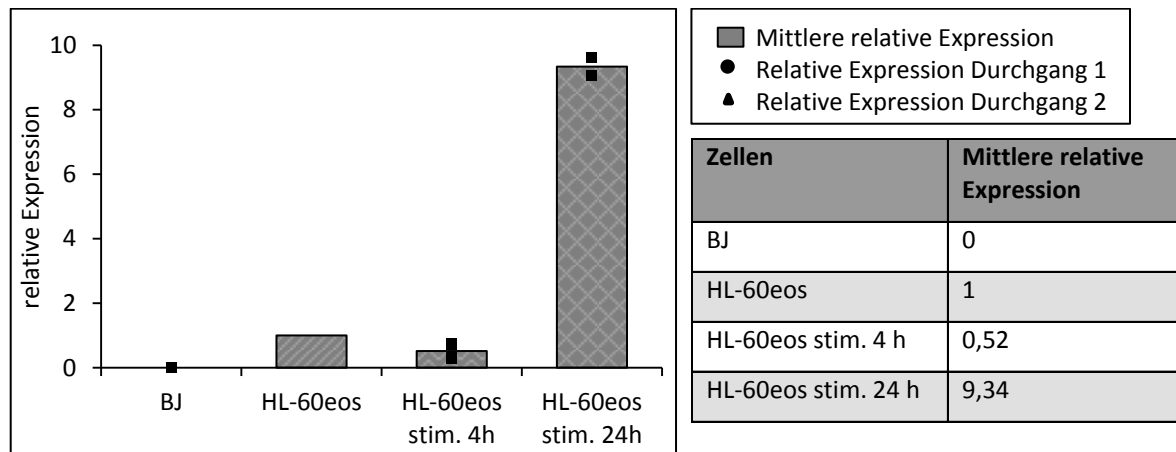


Abbildung 5.12 Mittels quantitativer Real-time-PCR ermittelte relative Expression von 5-LO in BJ- und unstimulierten sowie für 4 h und 24 h stimulierten HL-60eos Zellen. Die auf die 5-LO-Expression in unstimulierten HL-60eos-Zellen bezogene relative Expression wurde hierbei als Mittelwert (■) aus 2 unabhängigen Versuchen (● Durchgang 1, ▲ Durchgang 2) gebildet (Pearson-Korrelationskoeffizient: 0,99).

Die zur Beurteilung der Spezifität der entstandenen PCR-Produkte durchgeführte Schmelzkurvenanalyse (siehe Abbildung 5.13) zeigte, dass die Kurven aller mit NIP-30-Primern als Referenzgen versetzten Ansätze einen Peak bei 82 °C aufweisen, welches die für diese PCR-Fragmente spezifische Schmelztemperatur darstellt. Der Schmelzpunkt der 5-LO-PCR-Produkte ist bei einer Temperatur von 85 °C zu erkennen und ebenfalls spezifisch für diese Fragmente. Weder bei den mitgeführten Negativproben (Non-Template-Control) noch für den bereits besprochenen BJ-Zell-Ansatz mit 5-LO-Primern konnte ein signifikantes Fluoreszenzsignal in der Schmelzkurve nachgewiesen werden, weshalb in diesen cDNA-Proben nicht von der Entstehung von PCR-Produkten auszugehen ist.

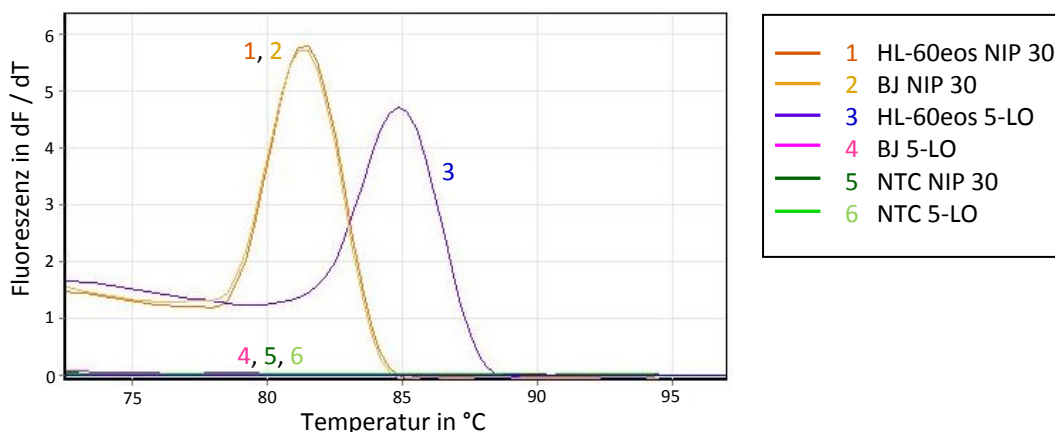


Abbildung 5.13 Repräsentative Schmelzkurve der mittels quantitativer Real-Time-PCR entstandenen NIP-30- sowie 5-LO-Produkte zum Nachweis der Spezifität der entstandenen PCR-Produkte. Aufgetragen wurden die relativen Fluoreszenzsignaldifferenzen der mit NIP-30- bzw. 5-LO-Primern amplifizierten BJ- sowie HL-60eos-cDNA-Ansätze gegen die Temperatur. Die Kurven der mit NIP-30-Primern versehenen HL-60eos- und BJ- cDNA-Ansätze sind hierbei deckungsgleich und daher nicht als separate Schmelzkurven zu identifizieren während die Kurven der Non-Template-Control (NTC) sowie die Schmelzkurve der mit 5-LO-Primern amplifizierten BJ-cDNA-Ansätze keinerlei Fluoreszenzen aufweisen und somit auf der Nulllinie liegen. Repräsentative Darstellung von insgesamt 2 Versuchen.

In Abbildung 5.14 ist repräsentativ für einen Real-Time-PCR-Lauf zum Expressionsnachweis von 5-LO das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese zum neben der Schmelzkurvenanalyse durchgeführten Nachweis der Spezifität der entstandenen PCR-Produkte darstellt. Hierbei sind deutliche Banden der NIP-30-Ansätze aller Zelllinien zu erkennen, welche auf einer Höhe von etwa 200 bp lokalisiert sind und somit der theoretischen Produktlänge von 203 bp entsprechen. Die Visualisierung der 5-LO-PCR-Produkte zeigt das Herausbilden von Banden bei ca. 150 bp für die Ansätze der unstimulierten und stimulierten HL-60eos-Zellen. Auch hier spricht die Nähe zu der theoretisch erwarteten Produktlänge von 151 bp für die Spezifität der entstandenen PCR-Produkte.

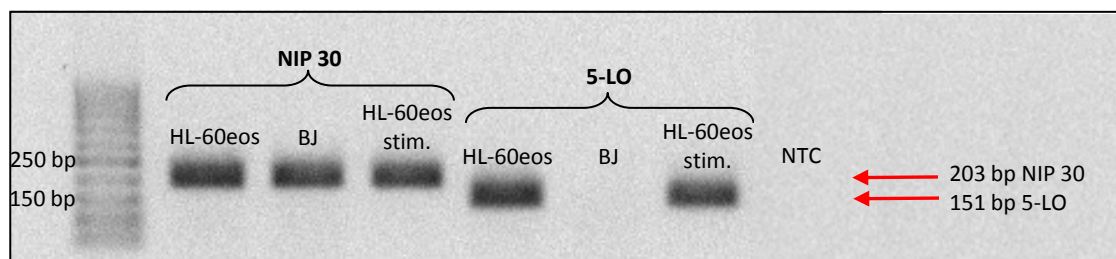


Abbildung 5.14 Repräsentative Darstellung einer Agarosegelelektrophorese der mittels quantitativer Real-Time-PCR entstandenen NIP-30- sowie 5-LO-Produkte zum Nachweis deren Spezifität. Für den Nachweis der 5-LO-Expression auf mRNA-Ebene wurden die NIP-30- und 5-LO-PCR-Produkte von BJ- und unstimulierten sowie für 4 h stimulierten HL-60eos-Zellen im Agarose-Gel aufgetragen sowie eine Non-template-control (NTC) als Negativkontrolle und ein DNA-Größenstandard mitgeführt. Die roten Pfeile signalisieren die Höhe der für NIP-30 bei 203 bp und für 5-LO bei 151 bp zu erwartenden Banden. Repräsentative Darstellung von insgesamt 2 Versuchen.

5.4.1.2 Expressionsnachweis von 5-LO auf Proteinebene

Die mittels Immunodetektion auf Basis von Western Blot durchgeführten 5-LO-Expressionsanalyse der HL-60eos sowie BJ-Zellen auf Proteinebene zeigte ausschließlich in den mit DMSO stimulierten HL-60eos-Zellen einen positiven Expressionsnachweis von 5-LO.

In den untersuchten, unbehandelten Zelllinien konnten unter Verwendung eines Lumineszenzviewers neben dem Proteinstandard keinerlei auswertbaren Banden auf der theoretisch für 5-LO erwarteten Höhe von 78 kDa detektiert werden (siehe Abbildung 5.15). Sowohl das als Größenstandard aufgetragene Reinprotein 5-LO, das zur Untersuchung einer möglichen Kreuzreaktion des Antikörpers mitgeführte Reinprotein FLAP, sowie die Gesamtproteinlösungen der HL-60eos- und BJ-Zellen zeigten nach der Immunfärbung kein Lumineszenzsignal. Somit konnte in den untersuchten BJ- sowie in den unstimulierten HL-60eos-Zellen mittels Immunodetektion die Expression der 5-Lipoxygenase nicht nachgewiesen werden.

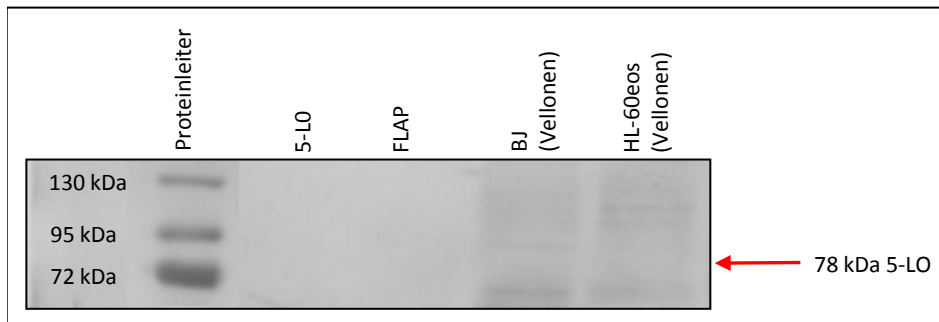


Abbildung 5.15 Immunodetektion von 5-LO in BJ- und unstimulierten HL-60eos-Zellen nach Isolation des Gesamtproteins mittels Vellonen-Lysepuffer. Zum Nachweis der 5-LO-Expression wurden jeweils 100 ng der Proteinlösungen sowie jeweils 50 µg 5-LO-Reinprotein als Größenstandard und FLAP-Reinprotein zur Untersuchung einer Kreuzreaktion des Anti-5-LO-Antikörpers in die SDS-PAGE aufgetragen und eine Proteinleiter als Proteinstandard mitgeführt. Der rote Pfeil signalisiert die Höhe der für 5-LO zu erwartenden Proteinbanden bei etwa 78 kDa. Repräsentative Darstellung von insgesamt 2 Versuchen.

Die Analyse der 5-LO-Expression in stimulierten HL-60eos-Zellen (siehe Abbildung 5.16) zeigte hingegen eine deutliche Herausbildung von Banden auf der Höhe von etwa 78 kDa für die mittels RIPA-Lysepuffer isolierten Proteinproben. Somit sind die stimulierten HL-60eos-Zellen als positiv hinsichtlich der 5-LO-Expression zu bewerten. Da sich das Lumineszenzsignal der Zellproben nach 24 stündiger Stimulation stärker als das nach 4 stündiger Stimulation darstellt, kann von einer vermehrten Expression von 5-LO in Zellen in Abhängigkeit der Inkubationszeit in der Stimulationslösung ausgegangen werden. Die mittels Vellonen-Lysepuffer isolierten Proteinansätze zeigen ebenso wie die aufgetragenen Reinproteine im Lumineszenzviewer kein detektierbares Signal.

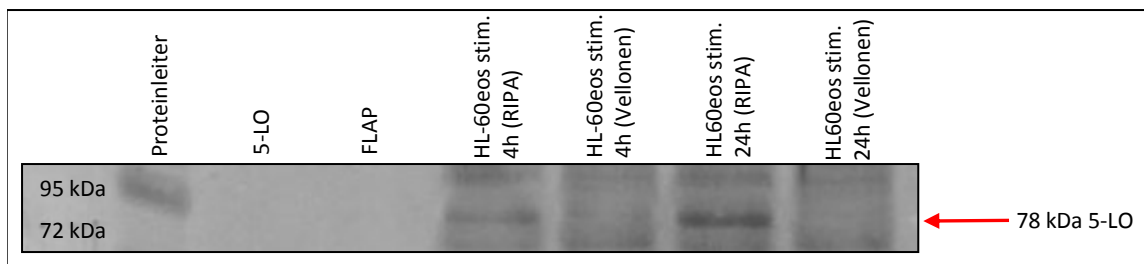


Abbildung 5.16 Immunodetektion von 5-LO in mit DMSO stimulierten HL-60eos-Zellen nach Isolation des Gesamtproteins mittels Vellonen- bzw. RIPA-Lysepuffer. Zum Nachweis der 5-LO-Expression wurden jeweils 100 ng der für 4 bzw. 24 h in Stimulierungsreagenz inkubierten Proteinlösungen sowie jeweils 50 µg 5-LO-Reinprotein als Größenstandard und FLAP-Reinprotein zur Untersuchung einer Kreuzreaktion des Anti-5-LO-Antikörpers in die SDS-PAGE aufgetragen und eine Proteinleiter als Proteinstandard mitgeführt. Der rote Pfeil signalisiert die Höhe der für 5-LO zu erwartenden Proteinbanden bei etwa 78 kDa. Repräsentative Darstellung von insgesamt 2 Versuchen.

Im Gegensatz zur mittels Immunodetektion nach Western Blot durchgeführten 5-LO-Expressionsanalyse, konnte mittels Durchflusszytometrie in den BJ-Zellen eine geringe Expression von 5-LO nachgewiesen werden, während die HL-60eos-Zellen eine deutliche, stimulationsabhängige Expression von 5-LO zeigten (siehe Abbildung 5.17).

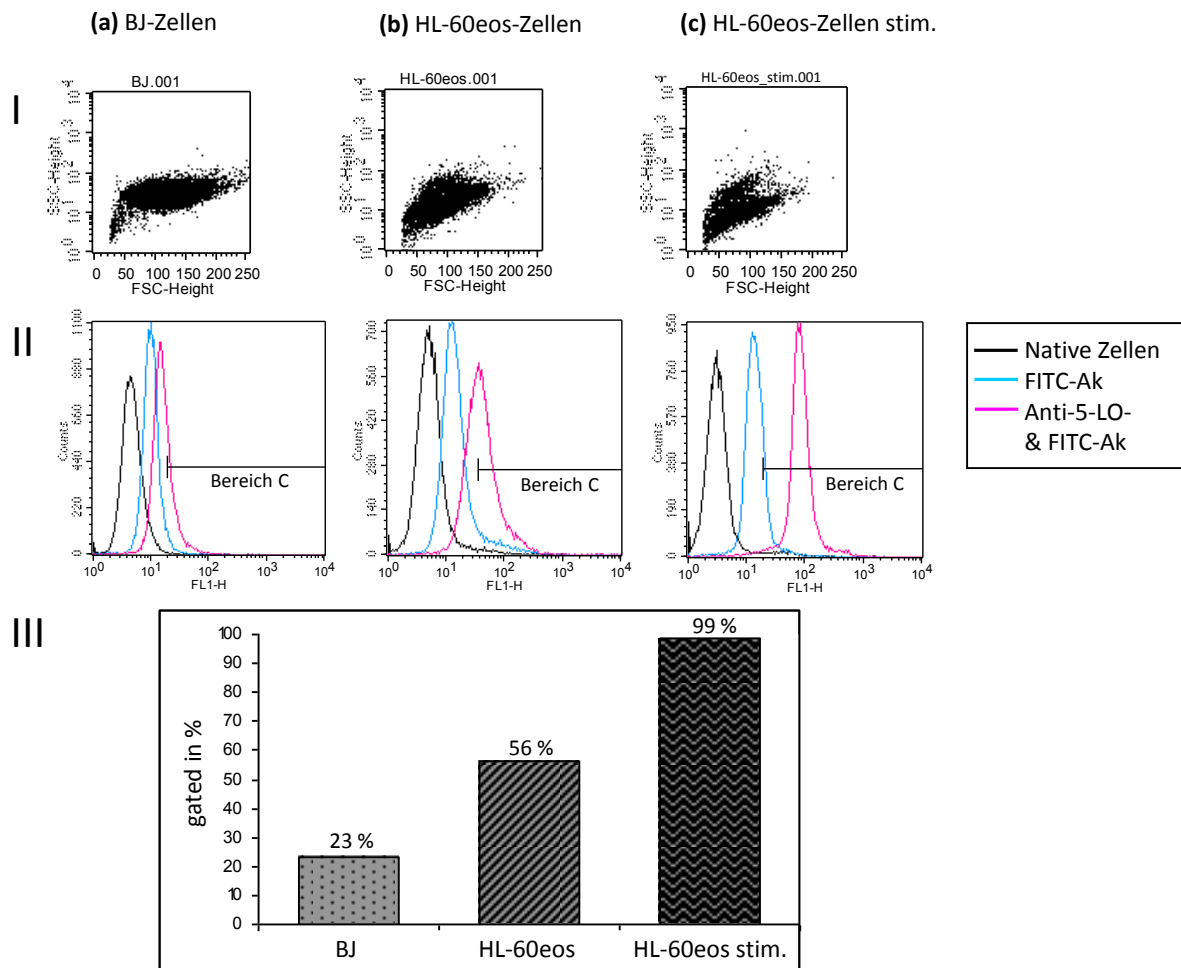


Abbildung 5.17 Repräsentatives Ergebnis des durchflusszytometrischen Expressionsnachweises von 5-LO in BJ- (a) und in unstimulierten (b) sowie stimulierten HL-60eos-Zellen (c). I Punktvolkendiagramme der im Vorwärtsstreulicht (FSC) sowie Seitwärtsstreulicht (SSC) vermessenen, bezüglich einer Antikörperinkubation unbehandelten, HL-60eos- bzw. BJ-Zellpopulation. II Histogramm-Plots mit dem gemeinsamen Auftrag des Fluoreszenzsignals der nativen Zellen (schwarz), der zur Beurteilung unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers nur mit dem FITC-konjugiertem-Sekundärantikörper inkubierten Zellen (blau) (= Negativkontrolle) sowie der mit Anti-5-LO-Primär- sowie FITC-konjugiertem Sekundärantikörper inkubierten Zellen (rosa) in einem Diagramm als Overlay. Die Zellzahl (y-Achse) wurde hierbei gegenüber der logarithmischen Einteilung der mittleren Fluoreszenzintensität der Zellen (x-Achse) aufgetragen. Der Bereich C, zur Darstellung der hinsichtlich des Antikörpers positiven Zellen, wurde in den Histogramm-Plots gekennzeichnet. Die in ihm enthaltenen Zellen wurden als prozentualer Anteil bezogen auf die gesamten vitalen Zellen des entsprechenden Ansatzes im Diagramm III für die BJ-Zellen sowie die stimulierten und unstimulierten HL-60eos-Zellen abgebildet. Die Ergebnisse wurden in einem Wiederholungsversuch bestätigt, dessen Daten hier nicht dargestellt sind (Pearson-Korrelationskoeffizient: 0,95).

Anhand der im Anschluss an die durchflusszytometrische Vermessung der Zellen erstellten Histogramm-Plots in Abbildung 5.17 (II) lassen sich für die mit Anti-5-LO-Primärantikörper sowie FITC-Sekundärantikörper inkubierten BJ-Zellen gegenüber den nativen Zellen zusätzliche Fluoreszenzsignale erkennen. Nach der Definition des Bereiches C (siehe Abschnitt 4.2.8.2.6) konnte ein geringer Anteil von 23 % der gesamten vitalen BJ-Zellen des Ansatzes aufgrund dieser im Vergleich zur Autofluoreszenz höheren Fluoreszenzintensitäten

als positiv hinsichtlich einer Bindung des eingesetzten Anti-5-LO-Primärantikörpers identifiziert werden.

In den Histogramm-Plots der HL-60eos-Zellen zeigten sich sowohl für die unstimulierten als auch die stimulierten Zellen nach Primär- und Sekundärantikörperinkubation deutlich höhere Fluoreszenzintensitäten gegenüber der gemessenen Autofluoreszenz der unbehandelten HL-60eos-Zellen. In diesen Ansätzen konnten als Ergebnis der nachfolgenden Auswertung 56 % von den unstimulierten HL-60eos-Zellen sowie insgesamt 99 % der stimulierten Zellen als positiv hinsichtlich des eingesetzten Anti-5-LO-Primärantikörpers festgestellt werden (siehe Abbildung 5.17 III). Nach der Expressionsuntersuchung mittels Durchflusszytometrie konnten somit die BJ-Zellen als negativ und die HL-60eos-Zellen als positiv hinsichtlich der 5-LO-Expression herausgestellt werden.

5.4.2 Expressionsnachweis von FLAP in HL-60eos- und BJ-Zellen

5.4.2.1 Expressionsnachweis von FLAP auf mRNA-Ebene

Zur mittels quantitativer Real-Time-PCR durchgeführten FLAP-Expressionsanalyse der HL-60eos sowie BJ-Zellen konnte in den BJ-Zellen keine Expression von FLAP nachgewiesen werden, während die HL-60eos-Zellen eine stimulationsabhängige Expression von FLAP zeigten.

Für die BJ-Zellen wurde eine gegenüber den als Referenz gewählten unstimulierten HL-60eos-Zellen mit 0,005fach eine vernachlässigbare FLAP-Expression ermittelt (siehe Abbildung 5.18), womit die BJ-Zellen als negativ hinsichtlich dieses Proteins eingeordnet werden können. Abbildung 5.18 zeigt weiterhin, dass durch Stimulation der HL-60eos-Zellen mit DMSO eine FLAP-Expressionssteigerung auf das 4fache nach 4stündiger bzw. auf das 8fache nach 24stündiger Stimulation erzielt werden konnte.

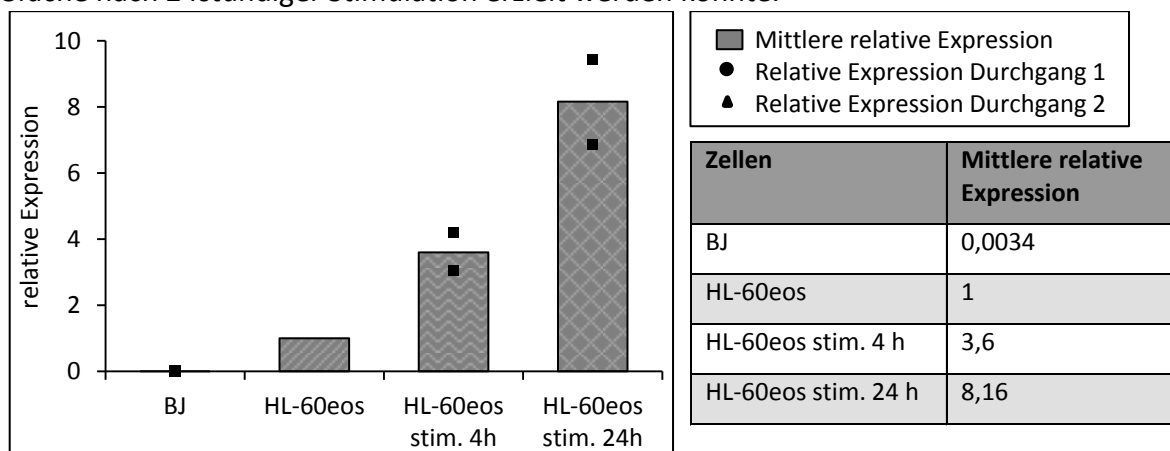


Abbildung 5.18 Mittels quantitativer Real-time-PCR ermittelte relative Expression von FLAP in BJ- und unstimulierten sowie für 4 h und 24 h stimulierten HL-60eos Zellen. Die auf die FLAP-Expression in unstimulierten HL-60eos-Zellen bezogene relative Expression wurde hierbei als Mittelwert (■) aus 2 unabhängigen Versuchen (● Durchgang 1, ▲ Durchgang 2) gebildet (Pearson-Korrelationskoeffizient: 0,94).

Die zur Beurteilung der Spezifität der PCR-Produkte durchgeführte Schmelzkurvenanalyse (siehe Abbildung 5.19) zeigte, dass die Kurven aller NIP-30-Primer enthaltenden Ansätze einen Peak bei 82 °C aufweisen, welches die für diese PCR-Fragmente spezifische Schmelztemperatur darstellt. Der für die FLAP-PCR-Produkte spezifische Schmelzpunkt ist bei einer Temperatur von ca. 79 °C sowohl für die Ansätze der BJ-Zellen als auch der HL-60eos-Zellen erkennen. Für die mitgeführten Negativproben (Non-Template-Control) konnte kein Peak des Fluoreszenzsignals in der Schmelzkurve nachgewiesen werden, weswegen in diesen nicht von der Amplifikation der cDNA auszugehen ist.

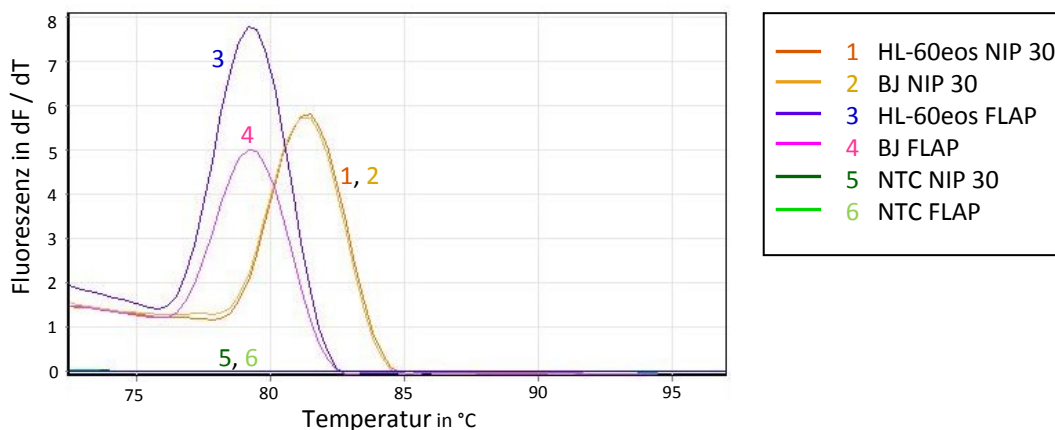


Abbildung 5.19 Repräsentative Schmelzkurve der mittels quantitativer Real-Time-PCR entstandenen NIP-30- sowie FLAP-Produkte zum Nachweis der Spezifität der entstandenen PCR-Produkte. Aufgetragen wurden die relativen Fluoreszenzsignaldifferenzen der mit NIP-30- bzw. FLAP-Primern amplifizierten BJ- sowie HL-60eos-cDNA-Ansätze gegen die Temperatur. Die Kurven der mit NIP-30-Primern versehenen HL-60eos- und BJ- cDNA-Ansätze sind hierbei deckungsgleich und daher nicht als separate Schmelzkurven zu identifizieren während die Kurven der Non-Template-Control (NTC) keinerlei Fluoreszenzen aufweisen und somit auf der Nulllinie liegen. Repräsentative Darstellung von insgesamt 2 Versuchen.

Eine neben der Schmelzkurvenanalyse im Rahmen der Untersuchung der Spezifität der PCR-Produkte durchgeführte Agarosegelelektrophorese ist repräsentativ für einen Real-Time-PCR-Lauf zum Expressionsnachweis von FLAP in Abbildung 5.20 dargestellt. Für alle untersuchten Zelllinien sind deutliche Banden der NIP-30- sowie FLAP-Ansätze zu erkennen, welche eine Lokalisation auf der Höhe von etwa 200 bzw. von 150 bp aufweisen. Die PCR-Produkte entsprechen somit den theoretischen Produktlängen von 203 bp für NIP-30 bzw. 143 bp für FLAP und können daher als spezifisch angenommen werden.

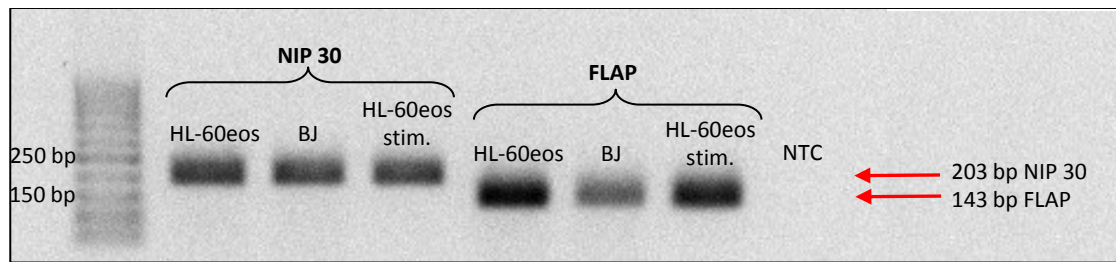


Abbildung 5.20 Repräsentative Darstellung einer Agarosegelelektrophorese der mittels quantitativer Real-Time-PCR entstandenen NIP-30- sowie FLAP-Produkte zum Nachweis deren Spezifität. Für den Nachweis der FLAP-Expression auf mRNA-Ebene wurden die NIP-30- und FLAP-PCR-Produkte von BJ- und unstimulierten sowie für 4 h stimulierten HL-60eos-Zellen im Agarose-Gel aufgetragen sowie eine Non-template-control (NTC) als Negativkontrolle und ein DNA-Größenstandard mitgeführt. Die roten Pfeile signalisieren die Höhe der für NIP-30 bei 203 bp und für FLAP bei 143 bp zu erwartenden Banden. Repräsentative Darstellung von insgesamt 2 Versuchen.

5.4.2.2 Expressionsnachweis von FLAP auf Proteinebene

Der Expressionsanalyse von FLAP in HL-60eos sowie BJ-Zellen auf Proteinebene mittels Immunodetektion nach Western Blot zeigte ausschließlich in den mit DMSO stimulierten HL-60eos-Zellen eine Expression von FLAP.

In den untersuchten, unbehandelten Zelllinien konnten unter Verwendung eines Lumineszenzviewers außer der Proteinleiter keinerlei Banden im für FLAP theoretisch erwarteten Bereich von 18 kDa visualisiert (siehe Abbildung 5.21) werden. Sowohl das als Größenstandard eingesetzte Reinprotein FLAP, das zur Untersuchung einer möglichen Kreuzreaktion des Anti-FLAP-Antikörpers mitgeführte Reinprotein 5-LO sowie die Gesamtproteinlösungen der HL-60eos- und BJ-Zellen zeigten nach der Immunfärbung kein Lumineszenzsignal, so dass die Expression von FLAP in diesen Proben nicht nachgewiesen werden konnte.

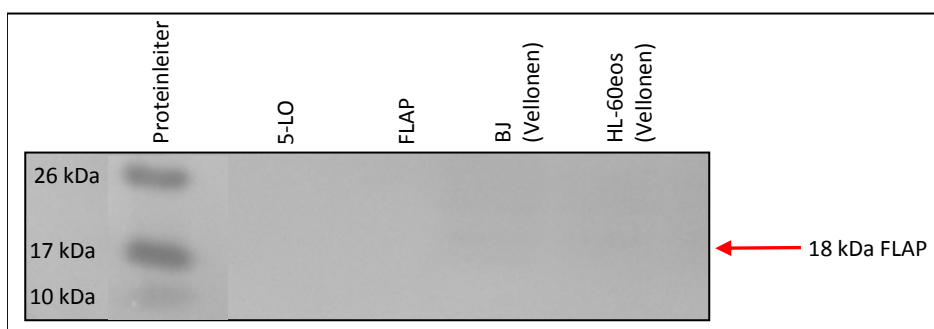


Abbildung 5.21 Immunodetektion von FLAP in BJ- und unstimulierten HL-60eos-Zellen nach Isolation des Gesamtproteins mittels Vellonen-Lysepuffer. Zum Nachweis der FLAP-Expression wurden jeweils 100 ng der Proteinlösungen sowie jeweils 50 µg FLAP-Reinprotein als Größenstandard und 5-LO-Reinprotein zur Untersuchung einer Kreuzreaktion des Anti-FLAP-Antikörpers in die SDS-PAGE aufgetragen und eine Proteinleiter als Proteinstandard mitgeführt. Der rote Pfeil signalisiert die Höhe der für FLAP zu erwartenden Proteinbanden bei etwa 18 kDa. Repräsentative Darstellung von insgesamt 2 Versuchen.

Die in Abbildung 5.22 dargestellte Expressionsanalyse von FLAP in den mittels RIPA sowie mittels Vellonen-Lysepuffer isolierten Proteinproben der stimulierten HL-60eos-Zellen lässt die Herausbildung von Banden auf einer für FLAP erwarteten Höhe von etwa 18 kDa in allen aufgetragenen Proteinlösungen deutlich erkennen. Die stimulierten HL-60eos-Zellen sind somit als positiv bezüglich der Expression von FLAP einzuschätzen. Das verstärkte Lumineszenzsignal von mittels Vellonen- gegenüber mittels RIPA-Lysepuffer isolierten Proteinlösungen deutet auf eine höhere Konzentration von FLAP in eben diesen Proben durch eine effizientere Isolierung der Proben mittels Vellonen-Lysepuffer hin. Aufgrund der ebenfalls gesteigerten Lumineszenzsignalintensität der Proteinlösungen von über einen Zeitraum von 24 h gegenüber den für 4 Stunden stimulierten Zellproben ist von einer vermehrten FLAP-Expression in den HL-60eos-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in DMSO-Stimulationslösung auszugehen. In den Slots der aufgetragenen Reinproteine 5-LO und FLAP ließen sich erneut mittels Lumineszenzviewer keine Banden detektieren.

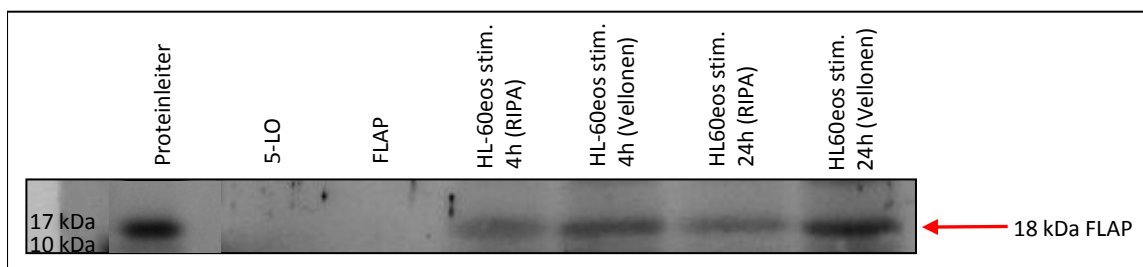


Abbildung 5.22 Immunodetektion von FLAP in mit DMSO stimulierten HL-60eos-Zellen nach Isolation des Gesamtproteins mittels Vellonen- bzw. RIPA-Lysepuffer. Zum Nachweis der FLAP-Expression wurden jeweils 100 ng der für 4 bzw. 24 h in Stimulierungsreagenz inkubierten Proteinlösungen sowie jeweils 50 µg FLAP – Reinprotein als Größenstandard und 5-LO-Reinprotein zur Untersuchung einer Kreuzreaktion des Anti-FLAP-Antikörpers in die SDS-PAGE aufgetragen und eine Proteinleiter als Proteinstandard mitgeführt. Der rote Pfeil signalisiert die Höhe der für FLAP zu erwartenden Proteinbanden bei etwa 18 kDa. Repräsentative Darstellung von insgesamt 2 Versuchen.

Die mittels Durchflusszytometrie durchgeführte FLAP-Expressionsanalyse auf Proteinebene zeigte im Gegensatz zur Immunodetektion eine geringe Expression von FLAP in BJ-Zellen, während die HL-60eos-Zellen eindeutig als positiv hinsichtlich einer FLAP-Expression herausgestellt werden konnten.

Für die BJ-Zellen lassen sich durch Analyse der im Anschluss an die durchflusszytometrische Vermessung der Zellen erstellten Histogramm-Plots (siehe Abbildung 5.23 II) für die mit Anti-FLAP-Primärantikörper sowie FITC-Sekundärantikörper inkubierten Zellen gegenüber den nativen Zellen zusätzliche Fluoreszenzsignale erkennen. Nach anschließender Definition eines Bereiches C in den Histogramm-Plots (siehe Abschnitt 4.2.8.2.6) konnte ein prozentualer Anteil von 46 % der gesamten vitalen BJ-Zellen des Ansatzes als positiv hinsichtlich einer Bindung des Anti-FLAP-Primärantikörpers erkannt und somit eine Expression von FLAP nachgewiesen werden.

In den Histogramm-Plots der unstimulierten und stimulierten HL-60eos-Zellen konnten nach Primär- und Sekundärantikörperinkubation deutlich höhere Fluoreszenzintensitäten gegenüber der gemessenen Autofluoreszenz der unbehandelten HL-60eos-Zellen nachgewiesen werden. Als Ergebnis der nachfolgenden Auswertung konnten 81 % der unstimulierten sowie 98 % der stimulierten Zellen als positiv hinsichtlich einer Bindung des Anti-FLAP-Antikörpers definiert und somit die Expression von FLAP in diesen Ansätzen gezeigt werden.

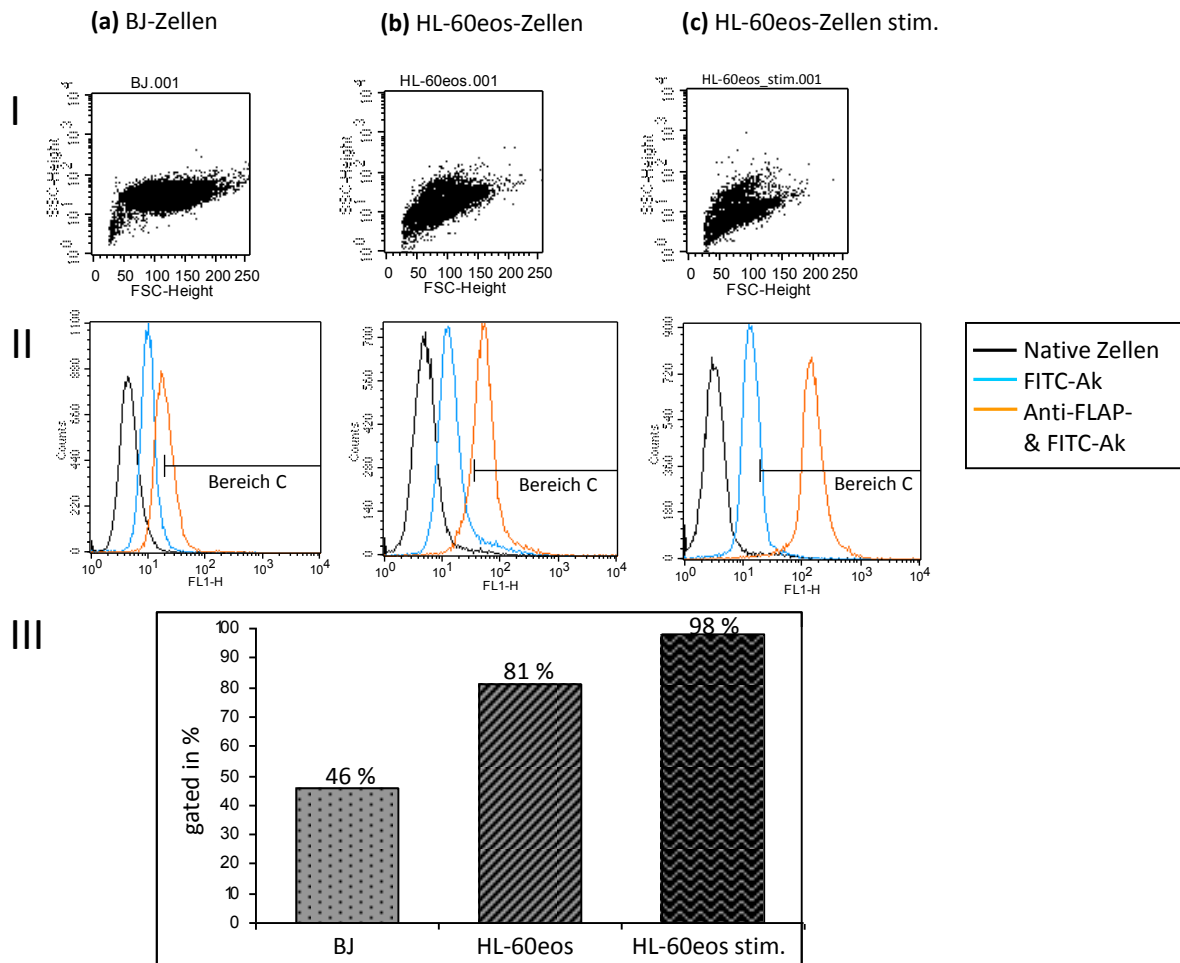


Abbildung 5.23 Repräsentatives Ergebnis des durchflusszytometrischen Expressionsnachweises von FLAP in BJ- (a) und in unstimulierten (b) sowie stimulierten HL-60eos-Zellen (c). I Punktwolkendiagramme der im Vorwärtsstreulicht (FSC) sowie Seitwärtsstreulicht (SSC) vermessenen, bezüglich einer Antikörperinkubation unbehandelten, HL-60eos- bzw. BJ-Zellpopulation. II Histogramm-Plots mit dem gemeinsamen Auftrag des Fluoreszenzsignals der nativen Zellen (schwarz), der zur Beurteilung unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers nur mit dem FITC-konjugiertem-Sekundärantikörper inkubierten Zellen (blau) (= Negativkontrolle) sowie der mit Anti-5-LO-Primär- sowie FITC-konjugiertem Sekundärantikörper inkubierten Zellen (orange) in einem Diagramm als Overlay. Die Zellzahl (y-Achse) wurde hierbei gegenüber der logarithmischen Einteilung der mittleren Fluoreszenzintensität der Zellen (x-Achse) aufgetragen. Der Bereich C, zur Darstellung der hinsichtlich des Antikörpers positiven Zellen, wurde in den Histogramm-Plots gekennzeichnet. Die in ihm enthaltenen Zellen wurden als prozentualer Anteil bezogen auf die gesamten vitalen Zellen des entsprechenden Ansatzes im Diagramm III für die BJ-Zellen sowie die stimulierten und unstimulierten HL-60eos-Zellen abgebildet. Die Ergebnisse wurden in einem Wiederholungsversuch bestätigt, dessen Daten hier nicht dargestellt sind (Pearson-Korrelationskoeffizient: 0,97).

5.5 Mikroskopische Darstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden in HL-60eos- und BJ-Zellen

Durch die lichtmikroskopische Darstellung der mit den spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden behandelten HL-60eos- sowie BJ-Zellen konnte sowohl die Aufnahme der Sonden in die Zellen als auch deren zellkernnahe intrazelluläre Lokalisation nachgewiesen werden.

Die mikroskopischen Aufnahmen aller mit der DY-505-Farbstofflösung oder den spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden inkubierten Zellproben zeigten vereinzelte Zellen unterschiedlicher Größe (ca. 10-30 μm) sowohl in der Phasenkontrastbildgebung als auch in der Fluoreszenzbildgebung (repräsentative Abbildung 5.24). Die Fluoreszenzsignale erwiesen sich hierbei insgesamt als sehr schwach, wobei der Fluoreszenzfarbstoff mit stärkster Signalintensität für alle Zellproben beider Zelllinien hierbei durchgehend Hoechst war.

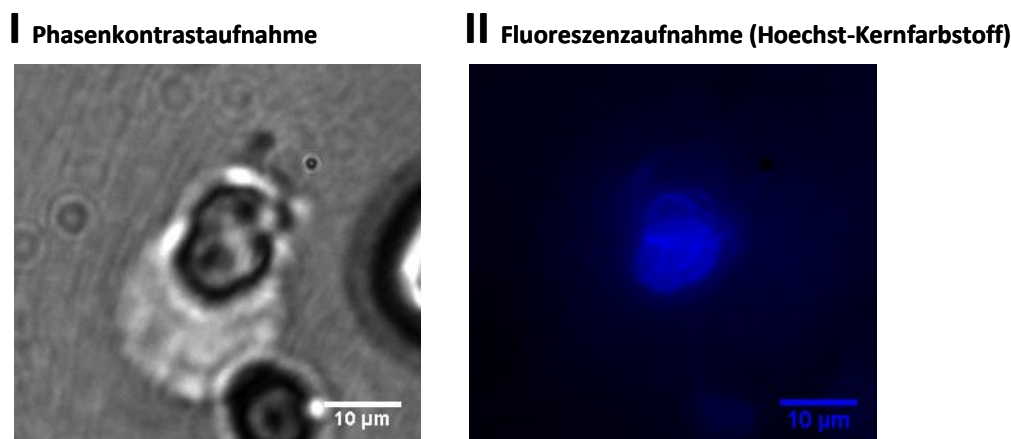


Abbildung 5.24 Repräsentative Phasenkontrast- (I) sowie Fluoreszenzaufnahme (II) der BJ-Zellen zur Lokalisation und Identifizierung der Zellen auf dem Objektträger. Die Markierung der Zellkerne in der Fluoreszenzbildgebung (II) erfolgte hierbei durch Färbung der Zellen mittels Hoechst-Kernfarbstoff und der Detektion dieser Fluoreszenzsignale durch Verwendung der in Tabelle 4.21 aufgeführten Filterkombination.

Die BJ-Zellen zeigten, wie in Abbildung 5.25 ersichtlich, nach Inkubation mit den verschiedenen Sondenlösungen neben dem Signal des Hoechst-Farbstoffes keinerlei weitere Fluoreszenzsignale. Auch unter Einstellung der maximalen Belichtungszeit, der Verwendung aller verfügbaren Filtersätze (siehe Tabelle 4.21) sowie der Maximierung des Kontrastes konnten die Fluorophore der Sonden in diesen Proben nicht detektiert werden.

Im Gegensatz hierzu konnten in mit den spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden behandelten HL-60eos-Zellen neben dem Signal des Hoechst-Kernfarbstoffes auch weitere deutliche Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.25). Dieses zusätzliche Signal ließ sich in den mit der DY-505-Anti-5-LO-Sonde inkubierten HL-60eos-Zellen ausschließlich mit dem „Set 09“-Filtersatz (siehe Tabelle 4.21) detektieren, weswegen es eindeutig als Fluoreszenz der DY-505-Sonde identifiziert werden konnte. Auch die Fluoreszenzen der mit

DY-682-Anti-5-LO-Sonde behandelten HL-60eos-Zellen konnten nur unter Einsatz des auf die Darstellung des DY-682-Signals abgestimmten Filtersatzes „Set-32“ (siehe Tabelle 4.21) visualisiert werden. In den mit DY-782-Anti-FLAP-Sonden inkubierten Zellen ließ sich zusätzlich zum Hoechst-Signal nur bei Verwendung des ICG-Filtersatzes (siehe Tabelle 4.21) ein weiteres Fluoreszenzsignal darstellen. Aufgrund der Detektion des Fluoreszenzsignals durch die den Fluorophoren DY-505, DY-682 sowie DY-782 angepassten Filtersätzen und der zusätzlichen Verifizierung der Zuordnung dieser detektierten Signale durch die Vermessung der Zellproben mit allen in der Tabelle 4.21 aufgeführten Filtersätzen (Mikroskopische Aufnahmen nicht dargestellt) bei maximaler Belichtungszeit kann von einem Nachweis der Sonden in den entsprechenden Wells der HL-60eos-Zellen ausgegangen werden. Die mikroskopischen Aufnahmen der HL-60eos-Zellen zeigten weiterhin eine Kolokalisation der Sonden zum Zellkern, da sich die Fluoreszenzsignale der Sonden aller Fluorophore nahezu deckungsgleich zu den Signalen des Hoechst-Kernfarbstoffes darstellen.

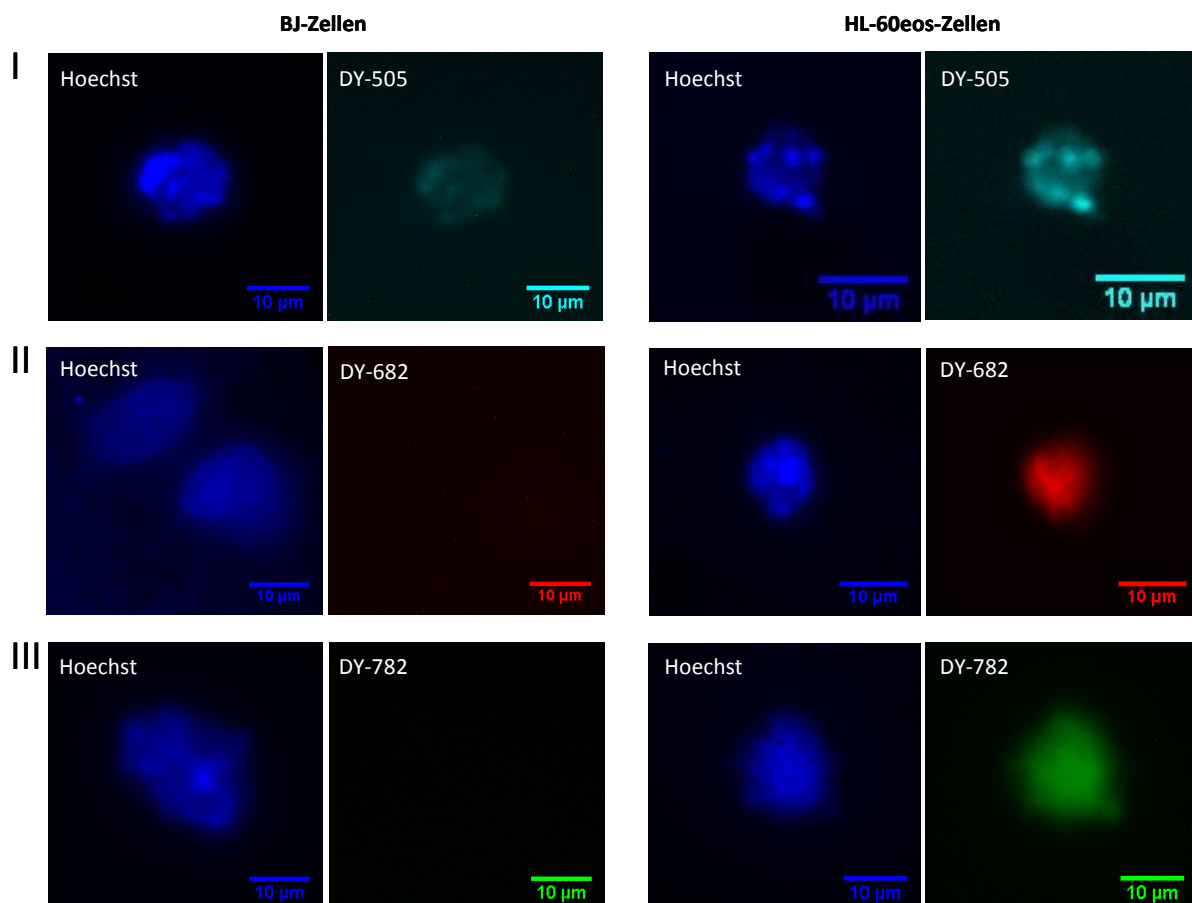


Abbildung 5.25 Mikroskopische Darstellung der mit (I) DY-505-Anti-5-LO-, (II) DY-682-Anti-5-LO bzw. mit (III) DY-782-Anti-FLAP-Sonden inkubierten und mit Hoechst-Kernfärbung gegengefärbten BJ- sowie HL-60eos-Zellen. Die sequenziellen Aufnahmen der Fluoreszenzsignale wurden hierbei mit den in Tabelle 4.21 beschrieben, auf die jeweiligen Fluorophore abgestimmten Filtersätzen erstellt, wobei dem Hoechstsinal blau zugewiesen wurde und die Fluoreszenzen des DY-505 cyan, des DY-682 rot und des DY-782 grün dargestellt wurden. Zur Optimierung der Bildqualität wurde in den mikroskopischen Aufnahmen bei der Darstellung der Sondenfluoreszenz eine Kontrastmaximierung durch Spreizung des Dynamikbereichs (siehe Abschnitt 4.2.9.3) erzielt.

Die zur Beurteilung der Autofluoreszenz der Zellen mitgeführte Negativkontrolle I (Ansatz 7, siehe Tabelle 4.20) sowie die Negativkontrolle II, zur Untersuchung einer unspezifischen Bindung des freien Farbstoffes (Ansatz 8, siehe Tabelle 4.20), zeigten unter Verwendung aller in Tabelle 4.21 aufgeführten Filtersätze weder für die BJ- noch für die HL-60eos-Zellen Fluoreszenzsignale (Aufnahmen nicht dargestellt). Somit ist weder von einer relevanten Autofluoreszenz der Zellen noch von wesentlichen unspezifischen Anlagerungen der Fluorophore an die Zellen auszugehen.

Die mikroskopischen Aufnahmen der mit den spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden des FRET-Paares (DY-682/DY-782) inkubierten BJ-Zellen (siehe Abbildung 5.26) zeigten auch bei maximaler Belichtungszeit und der Einsatz aller in Tabelle 4.21 aufgeführten Filtersätze ausschließlich die Fluoreszenz des Hoechstfarbstoffes unter Verwendung der „DAPI“-Filter (siehe Tabelle 4.21). Im Gegensatz hierzu ließen sich in den identisch behandelten HL-60eos-Zellen alle zugegebenen Fluorophore isoliert unter Verwendung der entsprechend angepassten Filtersätze nachweisen (siehe Abbildung 5.26). Die Vermessung der mit DY-682-Anti-5-LO- bzw. DY-782-Anti-FLAP-Sonden inkubierten HL-60eos-Zellen mit allen Filtersätzen (Set 09, siehe Tabelle 4.21) zeigten keine weiteren Fluoreszenzsignale (Mikroskopische Aufnahmen nicht dargestellt), womit die Zuordnung der detektierten Fluoreszenzsignale zu den zugegebenen Sonden verifiziert werden. Die Überlagerung der Aufnahmen des Hoechst-Signals mit denen der DY-682- sowie der DY-782-Fluoreszenzen aus dieser Probe lässt auf eine Kolokalisation dieser Fluorophore und somit auch der Sonden schließen.

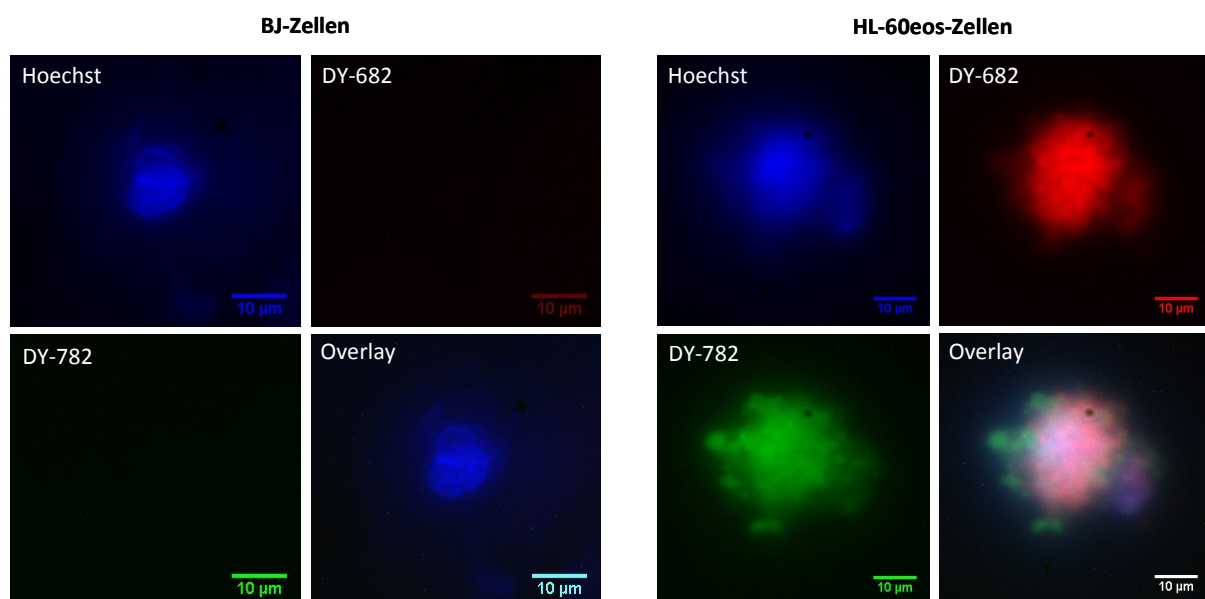


Abbildung 5.26 Mikroskopische Darstellung der mit den spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden des FRET-Paares (DY-682-Anti-5-LO, DY-782-Anti-FLAP) inkubierten, mittels Hoechst-Kernfärbung markierten BJ- sowie HL-60eos-Zellen. Zur Vermessung der Proben wurden hierbei die den jeweiligen Fluorophoren angepassten Filtersätze entsprechende der Tabelle 4.21 verwendet. Dargestellt sind die Signale des Hoechst-Farbstoffes und der Fluorophore DY-682/DY-782 einzeln sowie als Überlagerung dieser Einzelaufnahmen (= Overlay). Hoechst

wurde hierbei der blaue, dem DY-682-Fluorophor der rote und dem DY-782-Fluorophor der grüne Farbkanal zugeordnet. Zur Optimierung der Bildqualität wurde in den mikroskopischen Aufnahmen bei der Darstellung der Sondenfluoreszenz eine Kontrastmaximierung durch Spreizung des Dynamikbereichs (siehe Abschnitt 4.2.9.3) erzielt.

Bei den mikroskopischen Aufnahmen, der mit den Sonden des negativen FRET-Paares (DY-505/DY-782) inkubierten BJ-Zellen, ließ sich analog zu den mikroskopischen Bildern der Abbildung 5.26 auch bei maximaler Belichtungszeit sowie dem Einsatz aller Filtersätze (siehe Tabelle 4.21) lediglich ein Signal des Kernfarbstoffes nachweisen (siehe Abbildung 5.27). Die zu den BJ-Zellen identisch mit DY-505-Anti-5-LO- und DY-782-Anti-FLAP-Sonden behandelten HL-60eos-Zellen zeigen hingegen, wie in Abbildung 5.27 ersichtlich, neben der Fluoreszenz von Hoechst eine weiteres Signal bei Verwendung des dem DY-505 angepassten „Set 09“-Filtersatzes (siehe Tabelle 4.21). Zur Verifizierung der Zuordnung dieser detektierten Signale zu den Sonden, wurden die Zellproben mit allen in der Tabelle 4.21 aufgeführten Filtersätzen vermessen und dabei keine weiteren Fluoreszenzsignale ermittelt (Mikroskopische Aufnahmen nicht dargestellt). Das Overlay-Bild der Hoechst- und DY-505-Fluoreszenzsignale in den HL60eos-Zellen zeigt deutlich die räumliche Nähe dieser Fluorophore. Trotz der Zugabe der DY-782-Anti-FLAP-Sonde zu diesen Zellansätzen ist bei der Vermessung der Probe unter dem „ICG“-Filtersatz (siehe Tabelle 4.21) kein Signal des DY-782 detektierbar.

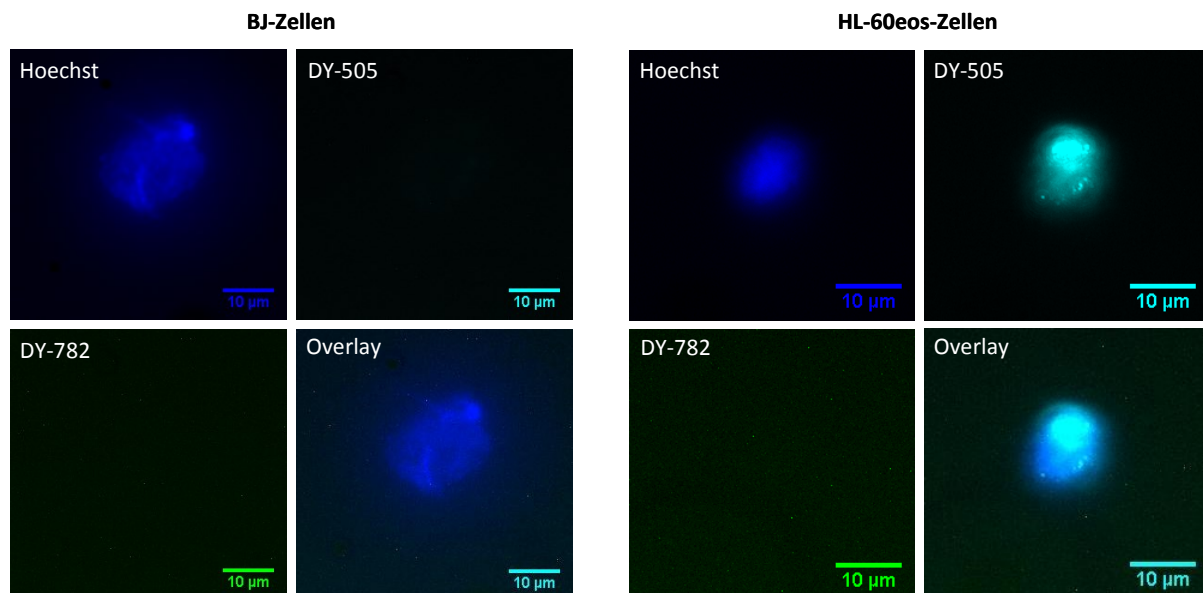


Abbildung 5.27 Mikroskopische Darstellung der mit den spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden des negativen FRET-Paares (DY-505-Anti-5-LO, DY-782-Anti-FLAP) inkubierten, mittels Hoechst-Kernfärbung markierten BJ- sowie HL-60eos-Zellen. Zur Vermessung der Proben wurden hierbei die den jeweiligen Fluorophoren angepassten Filtersätze entsprechende der Tabelle 4.21 verwendet. Dargestellt sind die Signale des Hoechst-Farbstoffes und der Fluorophore DY-505, DY-782 einzeln sowie als Überlagerung dieser Einzelaufnahmen (= Overlay). Hoechst wurde hierbei der blaue, dem DY-505-Fluorophor der cyane und dem DY-782-Fluorophor der grüne Farbkanal zugeordnet. Zur Optimierung der Bildqualität wurde in den mikroskopischen Aufnahmen bei der Darstellung der Sondenfluoreszenz eine Kontrastmaximierung durch Spreizung des Dynamikbereichs (siehe Abschnitt 4.2.9.3) erzielt.

6 Diskussion

Eine frühzeitige Diagnostik und Therapie von vor allem degenerativ-entzündlichen Erkrankungen erfordert die Entwicklung neuer Methoden zur Detektion und genauen Lokalisation von Entzündungsherden. In der vorliegenden Arbeit konnte hierfür ein Sondensystem zur Darstellung der Protein-Protein-Interaktion zwischen der 5-Lipoxygenase und ihrem aktivierendem Protein FLAP als Bestandteile komplexer inflammatorischer Prozesse entwickelt, charakterisiert und somit dessen grundsätzliche Eignung zur Darstellung von Entzündungsprozessen nachgewiesen werden.

Hierzu folgte im Anschluss an die Bestätigung der NIR-Fluorophore DY-505/DY-782 als negatives und DY-682/DY-782 als positives FRET Paar die Herstellung von Modell-Sonden mit welchen die einzelnen Parameter der Sondenherstellung optimiert, das molare Detektionslimit ermittelt sowie die Stabilität und Spezifität untersucht werden konnten. Nach der erfolgreichen Herstellung des spezifischen FLAP-5-LO-Sondensystems konnte dieses als positiv hinsichtlich eines FRET-Effekts bestätigt werden, während die Bindungsfähigkeit der Sonden nur partiell nachweisbar war. In dem entwickelten Zellmodell konnte anschließend die Aufnahme der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden in die Zellen sowie deren zellkernnahe intrazelluläre Lokalisation als Voraussetzung für eine Darstellung von Inflamationsprozessen mit diesem Sondensystem nachgewiesen werden.

FRET-Eigenschaften der Fluorophore DY-505, DY-682, DY-782

Die Analysen der FRET-Eigenschaften der Dyomics-Fluorophore DY-505, DY-682 und DY-782 konnten das Kontroll-Paar DY-505/DY-782 als negativ hinsichtlich eines FRET-Effekts bestätigen während das Fluorophor-Paar DY-682/DY-782 als FRET-Paar nachgewiesen werden konnte.

Die hierbei verzeichnete Abnahme der Donor- und gleichzeitige Zunahme der Akzeptorfluoreszenz des FRET-Paares beim Vergleich der Signale in Ab- und Anwesenheit des zweiten FRET-Fluorophors, weist auf den durch räumliche Nähe verursachten Energietransfer zwischen den Farbstoffmolekülen hin (⁵⁹). In den durchgeführten FRET-Untersuchungen am Membranmodell bewirkte die Anregung des Donors durch das Anregungslicht bei Anwesenheit des Akzeptorfluorophors einen strahlungslosen Energietransfer an diesen, weswegen ein Abfall der Donorfluoreszenz auf 63 % festzustellen war. Der Akzeptor emittierte hingegen in Folge dieser Energieübertragung Photonen und ein Anstieg der Akzeptorfluoreszenz auf 900 % war zu verzeichnen. Der für einen FRET-Effekt obligate Molekülabstand von < 10 nm (⁶⁰) ist durch die hohe räumliche Konzentration der

Fluorophore von 179 pmol/cm^2 und dem daraus resultierenden durchschnittlichen Donor- zu Akzeptorfluorophor-Abstand von 1 nm gewährleistet und liegt damit sogar deutlich unter dem für das Fluorophor-Paar DY-682/DY-782 bekannten Förster-Radius von 6,4 nm ⁽⁷⁷⁾.

Für das gewählte Kontroll-Paar konnten mit 110 % für den Donor und 80 % für den Akzeptor bei der Kolokalisation der Kontroll-Fluorophore keine größeren Fluoreszenzänderungen trotz Gewährleistung der räumlichen Nähe von Donor- und Akzeptorfluorophoren (1 nm, 179 pmol/cm^2) bei bekanntem Förster-Radius von 4,5 nm ⁽⁷⁷⁾ registriert werden. Daher ist hier kein Anhalt für einen Energietransfer zwischen den Fluorophoren gegeben, wobei in der Literatur keine konkreten Angaben bezüglich der zum Nachweis eines FRET-Effekts benötigten Mindestfluoreszenzänderung vorliegen.

Somit konnte auf Grundlage der festgestellten Fluoreszenzänderungen, des Vergleichs von FRET- und Kontroll-Paar sowie der Konformität der Daten mit den Voruntersuchungen dieser Fluorophore in der Arbeitsgruppe der Energietransfer mittels FRET zwischen DY-682 und DY-782 nachgewiesen werden. Die ausgewählten Fluorophore erweisen sich daher als geeignet für den Einsatz als positives- bzw. negatives FRET-Paar zur Entwicklung der Sonden.

Analyse der Modell-Sonden

Die in der nächsten Stufe der Sondenentwicklung erfolgte Analyse des optimalen Kopplungsverhältnisses zwischen IgG und Fluorophor zeigte für alle Modell-Sonden eine Minimierung des Quenchingeffekts bei einem Stoffmengenverhältnis von 6 : 1 zwischen Fluorophor und IgG.

Die zunächst in verschiedenen Stoffmengenverhältnissen zwischen Fluorophor und IgG (3 : 1, 6 : 1 sowie 12 : 1) hergestellten Sondenlösungen zeigten nach anschließender spektrophotometrischer Vermessung in den Absorptionsspektren Maxima bei 280 sowie z.B. 682 nm. Der Peak bei 280 nm ist hierbei nach ⁷⁸ auf das Vorhandensein von Seitenketten der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin sowie Cystein des IgG-Proteins in der Lösung zurückzuführen, während das Maximum bei z.B. 682 nm laut Herstellerangaben der Firma Dyomics dem Absorptionsmaximum des entsprechenden DY-682-Fluorophors entspricht. Die gleichzeitige Detektion von sowohl IgG als auch DY-682 in der aufgereinigten Sondenlösung spricht für eine erfolgreiche Kopplung der Fluorophore an den Antikörper wobei die ermittelte mittlere Anzahl pro Antikörper gebundener Fluorophore (Dye-Protein-Ratios) stets zwischen 1 und 2 lag und somit vergleichbare Werte zu den in der Literatur beschriebenen Dye-Protein-Ratios von 0,9 - 2,6 ⁽⁷⁹⁾ und 2,0 - 2,5 ⁽⁸⁰⁾ annahmen. Unterschiede wiesen die Spektren der Sondenlösungen jedoch in Bezug auf einen dem Fluorophor vorgelagerten Peak auf, der lediglich bei den im

Stoffmengenverhältnis von 3 : 1 und 12 : 1 zwischen Fluorophor und IgG gekoppelten Sondenlösungen auftritt. Dieser um einige nm in den UV-Bereich verschobene Peak kann für die 12 : 1 - Lösung durch das Vorliegen von H-Dimeren erklärt werden (⁵⁹), welche aufgrund der starken räumlichen Konzentration der Fluorophore infolge der hohen Anzahl gebundener Farbstoffmoleküle (im Durchschnitt 2 pro Antikörper) gebildet werden. Der durch dieses Phänomen entstandene so genannte Peak-Shift geht laut ⁸¹) mit einer Fluoreszenzauslöschung bzw. -verminderung einher, weswegen für die Sondenherstellung ein Stoffmengenverhältnis gewählt werden sollte, bei welchem dieser Quenchingeffect nicht zu beobachten ist. Der unerwartet aufgetretene dem Fluorophor vorgelagerten Peak der 3 : 1 - Lösung lässt sich hingegen aufgrund der geringeren räumlichen Konzentration der Farbstoffmoleküle nicht auf deren Wechselwirkungen im Rahmen von Quenchingprozessen zurückführen. Wegen des wiederholten Auftretens dieses Peaks in verschiedenen unabhängigen Ansätzen für alle Modell-Sonden ist ein Artefakt als Ursache auszuschließen und der biochemische Hintergrund des Peaks müsste in weiteren Untersuchungen - welche nicht Bestandteil dieser Arbeit sein sollen - nachgegangen werden. Aufgrund des bei einem Kopplungsverhältnis von 12 : 1 ermittelten Quenchingeffects und des unklaren vorgelagerten Peaks bei einem Verhältnis von 3 : 1 zwischen Fluorophor und IgG konnte das vom Hersteller Dyomics im Kopplungsprotokoll (⁶⁸, persönliche Mitteilung) angegebene Verhältnis von 6 : 1 für die Kopplungsreaktion als optimal bestätigt werden.

Bei dem Vergleich von Ultrafiltration und Größenausschlusschromatografie konnte das Verfahren der Ultrafiltration aufgrund der insgesamt signifikant geringeren absoluten Verluste an IgG ($p < 0,01$) sowie der signifikant höheren Aufkonzentrierung der finalen Sondenlösungen ($p < 0,001$) als optimales Aufreinigungsverfahren der Modell-Sonden ermittelt werden.

Bei der Chromatografie mittels Sephadex-Säule wurde aufgrund der beständigen Zugabe von PBS als mobile Phase zum Nachspülen auf die Säule die final aufgereinigte Sondenlösung verdünnt, weswegen in allen nachfolgenden Anwendungen der Sonde ein größeres Probenvolumen bei gleicher Fluorophormenge eingesetzt werden musste. Die Abgrenzung der einzelnen Fraktionen war bei dieser Aufreinigungsmethode zusätzlich zu der Verdünnung der Sondenlösung durch die Verwendung der im sichtbaren Licht nur schwach erkennbaren NIR-Fluorophore erschwert. Dies erklärt die ermittelten signifikant höheren IgG- sowie Fluorophorverluste gegenüber der Auftrennung mittels Ultrafiltration ($p < 0,05$). Neben diesen Fehlerquellen erweisen sich auch der hohe zeitliche Aufwand sowie die mit einer subjektiven Komponente belasteten Abschätzung der Fraktionen als Nachteile der

Größenausschlusschromatografie (⁸²). Das Verfahren der Ultrafiltration zeichnet sich hingegen zusätzlich zu den im Vergleich mit der Chromatografie berücksichtigten Kriterien (Minimierung von Materialverlusten und der Aufkonzentrierung der finalen Sondenlösung) durch einen geringeren Zeitaufwand sowie einer exakteren Trennung der freien Fluorophore von der Sondenlösung durch die selektiv permeable Membran aus. Aufgrund der in 3 unabhängigen Versuchen bestätigten Vielzahl an Nachteilen der Größenausschlusschromatografie gegenüber der Ultrafiltration ($p < 0,05$), konnte die Technik der Ultrafiltration somit eindeutig als optimales Aufreinigungsverfahren für die Sondenlösungen festgestellt werden.

Die Analyse des molaren Detektionslimits ergab eine zur Darstellung der Sonden auf Membranen mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager benötigte Mindeststoffmenge von etwa 0,0025 nmol Fluorophor pro Spot (entspricht 12,7 pmol/cm²). Weiterhin konnte eine hinsichtlich eines hohen Fluoreszenzsignals bei geringem Materialaufwand optimale Stoffmenge von 0,01 nmol/Spot ermittelt werden, welche einer Fluorophorkonzentration von 52 pmol/cm² entspricht. Es konnte festgestellt werden, dass die Signalintensität nur bis zu einer aufgetragenen Fluorophormenge von 0,01 nmol linear zur Konzentration wächst, während eine weitere Erhöhung der Fluorophormenge bis auf 0,04 nmol (203,8 pmol/cm²) aufgrund des bereits beschriebenen Quenchingeffekts kaum noch zu einer Signalzunahme führte. Bei einer Fluorophormenge von 0,01 nmol pro Spot (52 pmol/cm²) ist also das Verhältnis zwischen steigender Fluoreszenzintensität aufgrund der Fluorophormenge und Signalminderung in Folge des Quenching-Effekts - die Quantenausbeute - optimal, weswegen diese für alle weiteren Versuche die zum Auftragen auf die Membran angestrebte Fluorophormenge darstellte.

Die Untersuchung der Stabilität der Modell-Sonden zeigte über den analysierten Zeitraum von 8 Wochen eine signifikante Abnahme der Fluorophor-Protein-Ratio nach 3 Wochen ($p < 0,05$), einen weiteren deutlichen Abfall nach 4 Wochen ($p < 0,01$) und eine Abnahme bis auf 58 % des Ausgangswertes bis zum Ende des Untersuchungszeitraums ($p < 0,01$), während für die Fluorophorstabilität keinerlei zeitabhängige Veränderungen der Stabilität nachgewiesen werden konnten ($p > 0,05$).

Die Stabilität von Antikörperlösungen unterliegt hierbei ebenso wie die von Proteinlösungen in starkem Maße verschiedensten physikalischen sowie chemischen Einflüssen wie z.B. Temperatur, pH-Wert, Puffermedien, wiederholten Auftauprozessen (⁸³), Konzentrationen (⁸⁴) sowie Adsorptionsvorgängen der Proteine an Oberflächen. Bei der in dieser Arbeit

durchgeführten Stabilitätsuntersuchung erfolgte die Aufbewahrung der Sondenlösung bei der vom Hersteller des Antikörpers empfohlenen Temperatur von 4 °C sowie in Protein-Low-Bind-Cups. Die Verwendung derselben minimierte Fehler durch Reduktion der von ⁸⁵ ermittelten strukturellen Änderungen des Antikörpers infolge von Wechselwirkungen mit der Wand des Probengefäßes. Aufgrund dieser Berücksichtigung der Bedingungen zur optimalen Antikörperlagerung und der Durchführung einer Dreifachbestimmung aller Werte, können die ermittelten Daten der signifikanten Abnahme der Sondenstabilität bei Erhalt der Fluorophorstabilität als valide eingeschätzt werden. Es ist daher anzunehmen, dass die Stabilitätsabnahme über den beobachteten Zeitraum Folge eines Zerfalls der Sonde in Antikörper und den auch als Präzipitate beobachteten Fluorophoren infolge der Destruktion des Proteins ist. Mögliche Ursache hierfür ist der durch das Puffersystem PBS eingestellte pH-Wert von 7,4, welcher nicht in dem für die meisten Antikörper als Optimum beschriebenen leicht sauren Milieu von 5,0 - 5,5 (⁸⁶) liegt. So könnte eine durch pH-abhängige Konformationsänderungen verursachte Aggregation der Antikörper (³⁷) sowie Wechselwirkungen zwischen den Sonden untereinander zum Lösen von kovalenten Bindungen innerhalb des Antikörpers und somit zur Abspaltung der Fluorophore von den Antikörpern geführt haben. Die Verwendung der Sonden für die Zellversuche und für alle weiteren Anwendungsbereiche ist somit lediglich bis zur 3. Woche nach Herstellung aufgrund der anschließend nachlassenden Sondenstabilität und der damit verbundenen Abnahme des Fluoreszenzsignals zu empfehlen. Eine weitere Optimierung der Sondenstabilität könnte durch die Veränderung einzelner Aufbewahrungsparameter wie dem pH-Wert (5,0 - 5,5 nach ⁸⁶) sowie durch den Zusatz von stabilisierenden Substanzen (Glycerol, Phenole, etc.) erzielt werden.

Durch die Analyse der Bindungsfähigkeit der hergestellten Modell-Sonden mittels Dot Blot konnte die Spezifität deren Antikörper-Antigen-Bindung nachgewiesen werden.

Anhand der detektierten Fluoreszenzsignale über den Protein-Dots ließ sich hierbei eine Bindung aller Sonden an die Membran feststellen, welche aufgrund des schwachen Hintergrundsignals sowie der mitgeführten Kontrollen als spezifisch gegenüber dem Target identifiziert werden konnte. Die Ergebnisse sind hierbei aufgrund einer zweifachen technischen Wiederholung des Dot-Blots für jede der Modell-Sonden sowie der Konformität mit den Angaben des Herstellers Sigma Aldrich als valide einzuschätzen.

Demzufolge zeigten die im Rahmen der Analyse der Modell-Sonden durchgeführten Versuche neben der Bindungsfähigkeit der Modell-Sonden, eine optimale Sondenherstellung

in einem Kopplungsverhältnis von 6 : 1 zwischen Fluorophor und IgG bei nachfolgender Auftrennung mittels Ultrafiltration, eine hinsichtlich der Quantenausbeute optimale Darstellung der Sonden mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager bei einem Fluorophorauftrag von 0,01 nmol/Spot (52 pmol/cm²) sowie eine Haltbarkeitsbegrenzung der hergestellten Modell-Sonden von 3 Wochen bei anschließend nachlassender Stabilität. Diese Ergebnisse konnten anschließend für die Versuche mit den spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden genutzt werden.

Untersuchung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden

In der vorliegenden Arbeit konnte die erfolgreiche Herstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden gezeigt werden. So ließen sich für die gekoppelten DY-505- und DY-682-Anti-5-LO- sowie für die DY-782-Anti-FLAP-Lösung Proteinabsorptionspeaks bei 280 nm sowie Fluorophorspezifische Peaks messen. Da aufgrund der Ultrafiltration unter Verwendung von Centrifugal Filter Units mit einem Cut-Off von 10 kDa das Vorhandensein freier Fluorophore (Molekulargewicht < 1 kDa) in der Sondenlösung weitestgehend ausgeschlossen werden konnte, kann von einer erfolgreichen Sondenherstellung mit einer kovalenten Bindung von durchschnittlich 1,4 Farbstoffmolekülen pro Antikörper ausgegangen werden.

Beim Vergleich der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden und der fluorophormengen- und konzentrationsäquivalenten Farbstofflösungen hinsichtlich ihres Fluoreszenzsignals konnten keine relevanten Unterschiede der Signalintensitäten festgestellt werden. Somit konnte die von ⁶¹ beschriebene allgemeine Fluoreszenzabnahme von Fluorophoren nach Konjugation mit Proteinen in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Ursache dieser Diskrepanz sind vermutlich die hohen Dye-Protein-Ratios von > 2 der von ⁶¹ eingesetzten Sonden, in deren Folge laut ⁶¹ eine gegenseitige Fluoreszenzauslöschung aufgrund der räumlichen Nähe der Fluorophormoleküle untereinander zu beobachten war. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden wiesen hingegen mit durchschnittlich 1,4 pro Antikörper gebundenen Fluorophormolekülen eine deutlich geringere Dye-Protein-Ratio auf, weswegen für diese Sonden kein Self-Quenching der Fluorophore beobachtet wurde. Da für alle Sonden in drei unabhängigen Versuchen keine wesentlichen Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten gegenüber den Farbstofflösungen nachgewiesen werden konnten, lässt sich somit ein Einfluss der mit einer kovalenten Bindung an das IgG-Molekül einhergehende veränderte Ausrichtung der Fluorophormoleküle auf deren Fluoreszenzeigenschaften ausschließen. Die konstante Signalintensität der Antikörper-

gekoppelten Fluorophore gegenüber den freien Farbstoffmolekülen ermöglicht den Einsatz von zu den Voruntersuchungen äquivalenten Stoffmengen (0,01 nmol) bzw. Fluorophorkonzentrationen ($66,7 \mu\text{mol/l}\cdot\text{cm}^2$) für alle folgenden Versuche.

Die Analyse der hergestellten spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden auf einen FRET-Effekt bestätigte die Sonden DY-682-Anti-5-LO und DY-782-Anti-FLAP als positiv hinsichtlich eines solchen Energietransfers während für die DY-505-Anti-5-LO- und die DY-782-Anti-FLAP-Sonde kein FRET-Effekt nachgewiesen werden konnte. Bei gleichzeitiger Anwesenheit der DY-682-Anti-5-LO- sowie der DY-782-Anti-FLAP-Sonden (unter Konstanthaltung der Fluorophorkonzentration bei $94,8 \text{ pmol/cm}^2$) konnte durch die Abnahme der Donorfluoreszenz auf 63 % sowie Zunahme der Akzeptorfluoreszenz auf 183 % des Ausgangssignals die FRET-Eigenschaften der Fluorophore auch nach kovalenter Bindung an den Antikörper bestätigt werden. Der für die FLAP- bzw. 5-LO-Sondenlösungen in diesem Versuch ermittelte Donor-Akzeptormolekülabstand liegt mit 1,4 nm deutlich unter dem für DY-682/DY-782 angegebenen Försterradius von 6,4 nm ⁽⁷⁷⁾ womit auch hier die enge räumliche Nähe der Fluorophore als Voraussetzung für das Vorliegen eines FRET-Effekts gewährleistet ist. Der im Vergleich zu den freien Fluorophoren verzeichnete deutlich geringere Anstieg des Akzeptorsignals nach Kopplung an den spezifischen Antikörper kann durch den minimal vergrößerten Molekülabstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor von 1,4 nm (gegenüber 1 nm für die freien Fluorophore) mit der Folge einer verminderten Effizienz des FRET-Effekts ⁽⁵⁹⁾ erklärt werden. Zusätzlich ist eine Reduktion des Energietransfers vom Donor zum Akzeptor durch die bereits beschriebene räumliche Trennung der einzelnen Fluorophormoleküle infolge der Antikörperbindung denkbar ⁽⁸⁷⁾. Bei den Sonden des Kontroll-Paares (DY-505-Anti-5-LO/DY-782-Anti-FLAP) konnten ebenso wie bei den freien Fluorophoren trotz des Donor-Akzeptor-Abstandes von 1,4 nm (Förster-Radius nach ⁷⁷ für DY-505/DY-782: 4,5) keine größeren Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit der An- bzw. Abwesenheit der Partnersonde verzeichnet werden. Es ist somit nicht von einer Energieübertragung mittels FRET zwischen den DY-505- und den DY-782-Fluorophoren auszugehen. Die hergestellten Sonden erwiesen sich daher als geeignet für den Einsatz als FRET- bzw. als Kontroll-Sonden.

Im Gegensatz zu den Modellsonden (siehe Abschnitt 5.2.5) schlug die Analyse der Bindungsfähigkeit der hergestellten spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden mittels Dot Blot zum Nachweis der Spezifität deren Antikörper-Antigen-Bindung aus technischen Gründen fehl, da sich weder mit dem für die Modell-Sonden etablierten Versuchsaufbau noch nach

zusätzlicher Signalamplifikation durch Inkubation mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper Signale der spezifischen Sonden auf der Membran detektieren ließen. Aufgrund der 2 bis 8fachen Wiederholung des Dot-Blots für jede spezifische FLAP- bzw. 5-LO-Sonde sind die festgestellten Ergebnisse als valide einzuschätzen und der ausgebliebene Nachweis der Spezifität der Sonden daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine unzureichende Bindung der Proteine an die PVDF-Membran zurückzuführen. Da vor allem für relativ kleine Proteine wie die aufgetragene 5-Lipoxygenase und das 5-Lipoxygenase aktivierende Protein mit 100 bzw. 43 kDa eine mögliche Ablösung von der Membran aufgrund der vielen Wasch- und Inkubationsschritte beschrieben wird ⁽⁸⁸⁾, wurden im Anschluss an die Dot-Blot-Versuche verschiedene Proteinfärbung durchgeführt. Hierbei konnte mittels der SYPRO®-Ruby-Färbung der prinzipielle Erfolg des Blot-Vorgangs nachgewiesen werden. Mit 1 µg 5-LO bzw. FLAP liegt die auf die Membran aufgetragenen Proteinmenge zwar deutlich über der für alle Nachweise angegebenen Detektionsgrenze von 200 ng (Ponceau-Rot), 50 ng (Amidoschwarz sowie Coomassie) ⁽⁷²⁾ und 2-8 ng (SYPRO®-Ruby) ⁽⁷⁵⁾ pro Dot, dennoch war nur die SYPRO®-Ruby-Färbung sensitiv genug zur Visualisierung der Proteine. Mit seiner 60 mal höheren Sensitivität als die Ponceau-Rot-Färbung und der 20-30 mal höhere Sensitivität gegenüber des Amidoschwarz- und Coomassie-Proteinnachweises, konnte mittels SYPRO®-Ruby die Abwesenheit der Proteine als mögliche Ursache für die fehlgeschlagenen Dot-Blot-Experimente ausgeschlossen werden.

Obwohl die zum Nachweis des Erhalts der Fluoreszenzeigenschaften der Sonden unter der Membranbehandlung als Positivkontrolle aufgetragenen spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden vorwiegend aus Aminosäuren als Hauptbestandteile der Antikörper bestehen, konnten auch sie durch die Proteinfärbungen mit Ausnahme von SYPRO®-Ruby nicht visualisiert werden. Zwar ist die Grundlage aller Proteinfärbungen eine unspezifische Markierung von Proteinen durch die selektive Bindung des enthaltenen Farbstoffes an ausgewählte Aminosäuren mit für den jeweiligen Nachweis charakteristischen Eigenschaften ^(71, 73, 74), aber durch den von G. Edelman 1969 erstmals durchgeführten Nachweis des Vorkommens eines breiten Spektrums der durchschnittlich 1300 Aminosäuren in einem IgG-Molekül ⁽⁸⁹⁾ sind die Voraussetzung zur Bindung der Farbstoffe aller Proteinnachweise an die Antikörper der Sonde gewährleistet. So liegt die fehlgeschlagene Visualisierung der 0,3 - 0,6 µg IgG enthaltenden Positivkontrollen der DY-682-Anti-5-LO- und DY-782-Anti-FLAP-Sonden aller Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls in der mangelnden Sensitivität der konventionellen Protein-Färbemethoden begründet. Die im Gegensatz zum Nachweis der DY-682-Anti-5-LO- und DY-782-Anti-FLAP-Positivkontrollen erfolgreiche Darstellung der DY-

505-Anti-5-LO-Positivkontrolle mit allen Proteinfärbungen lässt sich vermutlich durch eine starke punktuelle Konzentrierung dieser Sonde in diesem Dot erklären. Diese ungewöhnlich starke Konzentrierung der DY-505-Positivkontrolle, welche aufgrund einer Überschreitung der Detektionsgrenze aller Proteinfärbungen zur Visualisierung der Positivkontrolle führt, wird durch den Vergleich der mittels Lumineszenz-Viewer erstellten Aufnahmen aller Membranen und der dabei ersichtlichen Überbelichtung der DY-505-Probe bestätigt. Als Ursache hierfür ist die methodisch bedingte Variabilität des Positivkontrollen-Sondenauftrags zu sehen, bei der die Positivkontrollen zur Vergleichbarkeit der Sinalintensitäten mittels MaestroTM-Fluoreszenz-Imager hinsichtlich ihrer enthaltenen Fluoreszenzstoffmengen und nicht aufgrund der enthaltenen IgG-Masse normiert wurden.

Im Gegensatz zur Analyse der Bindungsfähigkeit der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden mittels Dot Blot konnte mittels FACS-Durchflusszytometrie eine Bindung der DY-505-Anti-5-LO-Sonde in HL-60eos- und BJ-Zellen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich nach Inkubation mit der Sonde ein deutlicher Fluoreszenzanstieg in 44 % der hinsichtlich einer 5-LO-Expression als positiv ermittelten HL-60eos-Zellen (siehe Expressionsnachweis ab Seite 75). Ein Fluoreszenzanstieg konnte jedoch auch in 35 % der als negativ befundenen BJ-Zellen (siehe Expressionsnachweis ab Seite 75) verzeichnet werden. Ursache dieser geringen Unterschiede in den Resultaten der FACS-Analyse der HL-60eos- und BJ-Zellen sind möglicherweise auch durch ⁴⁷ sowie ⁹⁰ beobachteten unspezifischen Anlagerungen fluorophorhaltiger Sonden, welche auf eine Bindung der Fluorophormoleküle selbst an die Membran bzw. Proteine der Zelle (z.B. Integrine) zurückgeführt werden. Weiterhin ist anhand des auf Proteinebene mittels Western Blots und anschließender Immunodetektion fehlgeschlagenen 5-LO-Expressionsnachweises in unstimulierten HL-60eos-Zellen davon auszugehen, dass diese Zellen lediglich geringe Konzentrationen des 5-LO-Target-Proteins aufweisen welche für eine Untersuchung der Bindungsfähigkeit der DY-505-Anti-5-LO-Sonde an eben dieses nicht ausreichend sind. Mit einer Steigerung der 5-LO-Konzentration durch Stimulation der HL-60eos-Zellen mit DMSO sollte sich somit in zukünftigen Untersuchungen die Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung nachweisen lassen. Ebenso ist in weiterführenden durchflusszytometrische Analysen die Target-Spezifität der spezifischen DY-682-Anti-5-LO sowie der DY-782-Anti-FLAP-Sonden zu klären, welche derzeit aufgrund technischer Einschränkungen der FACS-Laser nicht durchgeführt werden kann. So ist es momentan nicht möglich Proben mit Laserlicht im roten Bereich über 635 nm bzw. im Nahinfraroten-Bereich anzuregen, weswegen mittels FACS-Analyse die DY-682-Anti-5-LO- sowie die DY-782-Anti-FLAP-Sonden nicht detektiert werden können.

Anhand der Resultate der durchflusszytometrischen Untersuchungen sowie der mittels Dot-Blot erzielten Ergebnisse der Analyse der Bindungsfähigkeit der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden ließ sich somit eine Spezifität der Antikörper-Antigen-Bindung nicht nachweisen. Diese Resultate sind jedoch auf methodische Gegebenheiten und nicht auf eine mangelhafte Bindungsfähigkeit der Sonden zurückzuführen, weshalb aufgrund der Angaben des Herstellers bezüglich der Antikörper von einer spezifischen Bindung an das entsprechende Target-Protein ausgegangen werden kann (Publikationen unter Verwendung dieser Antikörper liegen zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Dissertation nicht vor).

Somit konnte in dieser Arbeit die Entwicklung von spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden zur Detektion von Entzündungsprozessen im Rahmen des Leukotrienstoffwechsels nachgewiesen werden, da für die erfolgreich hergestellten Sonden eine hohe Signalintensität als Voraussetzung für eine Detektion der Sonden, sowie der erhaltene FRET-Effekt zum Nachweis einer Interaktion der Target-Proteine 5-LO und FLAP festgestellt und die Spezifität der Antikörper-Antigen-Bindung angenommen werden kann.

Expressionsnachweis von 5-LO und FLAP in HL-60eos- und BJ-Zellen

Die Untersuchung der unstimulierten und stimulierten HL-60eos- sowie BJ-Zellen auf eine Expression von 5-LO und FLAP zeigte eine Expression der Proteine in den HL-60eos-Zellen während die BJ-Zellen als Negativzelllinie bestätigt werden konnten.

Die BJ-Zellen konnten hierbei sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene als negativ hinsichtlich der Expression von 5-LO ermittelt werden, da sich weder bei der Analyse der PCR-Produkte noch bei der Immunodetektion Banden des Proteins auf der erwarteten Höhe nachweisen ließen. Der bei der FACS-Analyse ermittelte Anstieg des Fluoreszenzsignals in 23 % der mit der Anti-5-LO-Sonde inkubierten Zellen lässt sich auf die bereits beschriebene, von ⁴⁷ sowie ⁹⁰ festgestellte, unspezifische Bindung der Fluorophore an die Zellen zurückführen sowie durch eine unspezifische Anlagerung des konstanten Fc-Abschnitts der Antikörper an die Zellen (³⁷) erklären. Diese Daten sind aufgrund ihrer Reproduzierbarkeit in jeweils einem Wiederholungsversuch sowie der Konformität der Ergebnisse der zwei durchgeführten unabhängigen Nachweisverfahren auf mRNA- sowie Proteinebene als valide einzuschätzen. Bei dem Nachweis des 5-Lipoxygenase aktivierenden Proteins in den BJ-Zellen, konnte eine sehr geringe relative Expression auf mRNA-Ebene nach PCR-Analyse sowie auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie festgestellt werden. Da die im Agarosegel auf der Höhe von 143 bp befindliche Bande der PCR-Produkte nach Überprüfung der Genstruktur als spezifisch für die

FLAP-Genprodukte identifiziert werden konnte, lässt sich auch für die zu 46 % positiv angegebenen Zellen der FACS-Durchflusszytometrie von einer Fluoreszenzsignalsteigerung infolge von Target-spezifischen Bindungen der Sonde zusätzlich zu den unspezifischen Bindungen des Antikörpers und des Fluorophors ausgehen. Obwohl die BJ-Zellen schwach positiv hinsichtlich einer FLAP-Expression sind, ließen sich mittels Immunodetektion in den Western Blots keine Proteine der angenommenen Größe von 18 kDa darstellen. Diese Methode ist offensichtlich für die geringen in den BJ-Zellen enthaltenen FLAP-Mengen nicht sensitiv genug. Die isolierte Expression von FLAP ohne Koexistenz der 5-Lipoxygenase ist hinweisend auf eine zusätzliche Funktion von FLAP neben der von ⁹¹ erstmal beschriebenen Aktivierung des Enzyms 5-LO im Rahmen der Leukotriensynthese bei inflammatorischen Prozessen. Eine weitere Rolle von FLAP ist derzeit jedoch nicht bekannt und so wird auch in der neueren Literatur lediglich von der Beteiligung an der Produktion von Entzündungsmediatoren in Zusammenarbeit mit der 5-Lipoxygenase berichtet (¹⁷, ¹⁸). Aufgrund der Abwesenheit von 5-LO und der im Vergleich zu den HL-60eos-Zellen deutlich geringeren FLAP-Expression konnten die BJ-Zellen als negativ konntten die BJ-Zellen dennoch als negativ hinsichtlich der Leukotriensynthese und damit als geeignete Kontrollzelllinie für die spätere mikroskopische Analyse der intrazellulären Lokalisation der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden *in vitro* identifiziert werden. Diese Ergebnisse werden zusätzlich durch die Angaben in der Literatur bestätigt, welche die Existenz von 5-LO lediglich in bestimmten aus dem Knochenmark stammenden Zellen wie z.B. Neutrophilen, Eosinophilen, Monozyten, Makrophagen (²⁰) (²¹) und nicht in Endothelzellen, T-Lymphozyten, Erythrozyten sowie humanen Fibroblasten wie den BJ-Zellen (⁹²) nachweisen konnten.

Für die HL-60eos-Zellen wurde sowohl auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR als auch auf Proteinebene durch die FACS-Analyse eine Expression von 5-LO- sowie FLAP nachgewiesen und damit die von ²⁰ beschriebene Produktion von Leukotrienen in diesen eosinophilen Granulozyten bestätigt. Der fehlgeschlagene Expressionsnachweis mittels Immunodetektion im Western Blot liegt abermals in der geringeren Sensitivität dieser Methode gegenüber der FACS-Durchflusszytometrie sowie der Real-Time-PCR begründet. Da die auf mRNA-Ebene ermittelte relative Expression der Proteine gegenüber der Kontrollzelllinie (BJ-Zellen) um einen Faktor > 200 erhöht war und sich auch bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen eine Verdopplung der Fluoreszenzintensität gegenüber den BJ-Zellen zeigte, erweisen sich die HL-60eos-Zellen als geeignete Positivzelllinie für die geplanten *in vitro* Versuche.

Die Stimulation der HL-60eos-Zellen durch Zugabe von DMSO führte zu einer zusätzlichen Expressionssteigerung der Targetproteine auf mRNA- sowie Proteinebene. Bereits 1999

wurde von ⁹² diese Zunahme der Expression mittels Differenzierungsreagenzien wie DMSO beschrieben und durch die *in vivo* ablaufende natürliche Hochregulation der 5-LO und FLAP in der Differenzierungsphase der Leukozyten im Knochenmark erklärt (⁹³). Bei der Real-Time-PCR-Analyse der mRNA-Expression fällt ein der Expressionssteigerung nach 24 Stunden DMSO-Behandlung vorausgehender geringfügiger Abfall der 5-LO-mRNA nach 4stündiger Stimulation auf, während für die FLAP-mRNA eine stetige Expressionszunahme zu verzeichnen ist. Diese Ergebnisse sind aufgrund der Reproduzierbarkeit in 3 unabhängigen Experimenten als valide einzuschätzen und daher auf zellbiologische Prozesse zurückzuführen. Sie decken sich mit denen von ⁹⁴ sowie ⁹⁵, wobei Martel-Pelletier als Ursache des verzögerten Anstiegs der 5-LO-mRNA nach Stimulation eine spätere Hochregulation der Lipoxxygenase gegenüber dem FLAP-Protein vermutet. Diese später beginnende Expressionssteigerung von 5-LO gegenüber FLAP könnte im Zusammenhang mit dem reversiblen antiproliferativen Effekt von DMSO den kurzzeitigen Abfall der 5-LO-mRNA erklären, welcher bereits für verschiedenste Zellen myeloiden Ursprungs wie B- und T-Lymphozyten (⁹⁶), Makrophagen (⁹⁷) sowie den HL-60-Zellen als Ursprungs-Phänotyp der HL-60eos Zellen (⁹⁸) beschrieben wurde. Ursachen dieser beobachteten DMSO-induzierten Wachstumsstagnation sind nach ⁹⁹ konzentrationsabhängige Veränderung an der Mitochondrienmembran verbunden mit einer bereits 1988 von Birnie festgestellten Downregulation des Proto-Onkogens „c-myc“ (¹⁰⁰), welche ab 2 % DMSO (v/v) laut ⁹⁷ zur Apoptose von Zellen und bei der Zugabe von 1,5 % DMSO (v/v) zum reversiblen Stillstand des Zellzyklus in der G1-Phase für 96 h (⁹⁶) führt. Die in dieser Arbeit verwendet geringere DMSO-Konzentration von 1 % (v/v) könnte hierbei zur schnelleren Erholung der HL-60eos-Zellen beigetragen und somit eine Expressionssteigerung von 5-LO bereits nach 24 h ermöglicht haben, wobei eine genauere Analyse dieses Sachverhalts nicht Gegenstand dieser Arbeit war und daher auf weitere Untersuchungen diesbezüglich verzichtet wurde.

Für die Expressionsanalyse von 5-LO auf Proteinebene mittels Western Blot und Immunfärbung war trotz dieses festgestellten 5-LO-mRNA-Abfalls in stimulierten HL-60eos-Zellen nach 4 Stunden eine Detektion von Proteinbanden auf der Höhe des den Targetproteinen entsprechenden Molekulargewichts möglich. Diese erfolgreiche Visualisierung der Proteine ist somit auf einen DMSO-induzierten Anstieg der Proteinkonzentrationen in den Nachweisbereich des Lumineszenzviewers zurückzuführen. Das für den 5-LO-Nachweis festgestellte stärkere Signal der mittels RIPA-Puffer lysierten Zellisolate, lässt auf eine zytosolische, intranukleäre oder mitochondriale Lokalisation dieses Enzyms schließen, da erfolgreiche Proteinisolationen mittels RIPA als Lysereagenz vor allem

in diesen Zellkompartimenten angegeben werden (¹⁰¹). Erste Analysen von ¹⁶ sowie neuere Untersuchungen durch ¹⁰² und ¹⁰³ konnten das Vorkommen der 5-LO im zytoplasmatischen Raum bestätigen und zusätzlich eine Translokation des Enzyms in perinukleäre Bereiche nach Stimulation der Zellen feststellen. Beim Nachweis von FLAP im Gesamtproteinisolat der stimulierten HL-60eos-Zellen zeigten sich verstärkte Banden bei den mittels Vellonen-Lysepuffer extrahierten Proteinen. Dieser Puffer erweist sich als optimal hinsichtlich der Isolation von Membranproteinen (¹⁰⁴), weshalb die Ausbeute des kernmembranständig lokalisierten FLAP-Proteins (¹⁶) bei der Lyse nach Vellonen gegenüber den Zellisolaten mittels RIPA-Lyse-Verfahren deutlich erhöht war. Weiterhin ließen sich sowohl für FLAP als auch für 5-LO in der Immunodetektion mittels Western Blot signalstärkere Banden der Proteinproben nach 24stündiger DMSO-Inkubation der Zellen gegenüber den Proteinproben der über einen Zeitraum von nur 4 Stunden stimulierten Zellen darstellen. Diese Ergebnisse sind hinweisend auf eine deutliche DMSO-induzierte Steigerung der Proteinexpression in Abhängigkeit der Verweildauer in der Stimulationslösung und stehen in Übereinstimmung mit der Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene, bei der auch erst nach 24stündiger Stimulation das Maximum der Expression ermittelt wurde. Somit kann von einer späten DMSO induzierten Hochregulation der Target-Proteine ausgegangen werden. Diese Annahme deckt sich mit den Ergebnissen von ⁹⁵, welcher unter Verwendung verschiedenster Wachstumsfaktoren zur Stimulation der Zellen ebenfalls eine späte auf Transkriptionsebene regulierte Expressionssteigerung von 5-LO- sowie FLAP nachweisen konnte.

Durch die FACS-Analyse der stimulierten HL-60eos-Zellen konnte analog zu den Untersuchungen mittels Real-Time-PCR sowie Immunodetektion eine deutliche Expressionssteigerung der Target-Proteine festgestellt werden. Allerdings war die durchflusszytometrische Analyse einiger Zellproben hinsichtlich Art und Menge der in der Probe befindlichen Zellen hinweisend auf das Vorhandensein verschiedener Zellpopulationen (entsprechende Punktwolkendiagramme nicht dargestellt) weshalb diese somit für den Einsatz zur Expressionsanalyse nicht geeignet waren. Ursache dieser zusätzlichen Zellpopulation könnte die vom Lieferant der Zellen sowie auch durch ¹⁰⁵ beschriebene Fähigkeit der HL-60eos-Zellen sein, sich zu einem gewissen Grad wieder in den Ursprungs-Phänotypen - die HL-60-Zellen - zurückzuwandeln. Da der molekulare Mechanismus Rückbildung der HL-60eos-Zellen bisher in der Literatur nicht genauer beschrieben wurde, lässt sich über eine Umkehr der bei der Differenzierung ablaufenden zellulären Prozesse nur spekulieren: Bekannte Mechanismen des *in vivo* Zytokin- induzierten Differenzierungsprozesses sind einerseits die Acetylierung bestimmter Histone sowie die Aktivierung verschiedenster Transkriptionsfaktoren (¹⁰⁵, ¹⁰⁶, ¹⁰⁷, ¹⁰⁸, ¹⁰⁹). Eine möglicherweise

DMSO-induzierte Deacetylierung der entsprechenden Histone sowie die Unterdrückung der eosinophilen Gen-Transkription durch eine von ¹¹⁰ beschriebene Deaktivierung der C/EBP-Transkriptionsfaktoren könnte zur Rückwandlung der HL-60eos-Zellen in die undifferenzierten HL-60-Zellen geführt haben. Die Entstehung von HL-60-Zellen mit einer potentiell veränderten Expression der Target-Proteine gegenüber den bereits untersuchten HL-60eos-Zellen erweist sich als potentieller Störfaktor für die nachfolgenden *in vitro* Zellversuche. Daher wurde für diese Untersuchungen zur Vermeidung der vereinzelt Entwicklung der morphologisch sowie funktionell verschiedenen Zellpopulationen (HL-60eos- bzw. HL-60-Zellen) auf eine vorherige, DMSO-induzierte Stimulation der HL-60eos-Zellen verzichtet wurde.

Aufgrund der Konformität der Ergebnisse der Expressionsanalyse mit den Daten der Literatur können die Resultate als valide eingeschätzt und somit die BJ-Zellen als geeignete Kontrollzelllinie identifiziert werden, während sich die unstimulierten HL-60eos-Zellen aufgrund ihrer Expression von 5-LO und FLAP als Positivzelllinie für die nachfolgenden mikroskopischen Darstellungen der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden *in vitro* erwiesen haben.

Mikroskopische Darstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden in HL-60eos- bzw. BJ-Zellen

Durch die lichtmikroskopische Darstellung der mit den spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden behandelten HL-60eos- sowie BJ-Zellen *in vitro* ließ sich die Aufnahme der Sonden in die Zellen sowie deren zellkernnahe intrazelluläre Lokalisation nachgewiesen.

Die Fluoreszenzsignale waren zwar insgesamt sehr schwach, aber dennoch für alle Farbstoffe in den entsprechenden Proben neben dem Signal des Hoechstfarbstoffes eindeutig detektierbar. Als Ursachen der geringen Signalintensität kommen prinzipiell *a)* ein Quenchingeffekt infolge der Behandlung der Zellen, *b)* eine insgesamt geringe Konzentration Antikörper-gebundener Fluorophore und des Hoechts-Kernfarbstoffes sowie *c)* das Photobleaching der Proben durch das Anregungslicht in Frage.

Da sowohl das Signal des Hoechst-Farbstoffes als auch der Dyomics-Fluorophore schwach ist, gilt ein durch das Eindeckmedium oder die Behandlung der Zellen induzierter Quenching-Vorgang als wahrscheinlichste Erklärung der geringen Signalintensität. Nach Herstellerangaben von Thermo Fischer Scientific ist das eingesetzte Permafluor aufgrund der Reduktion von Quenchingprozessen, in dessen Folge ein partieller Schutz der Fluorophore vor dem Ausbleichen erzielt wird, jedoch gerade zur Anwendung bei fluoreszierenden Proben indiziert. Auch für die weiteren zur Behandlung der Zellproben eingesetzten Reagenzien wie Tween 20[®] und Triton-X[®]-100 ließen sich in der Literatur keine Anhaltspunkte bezüglich einer störenden Autofluoreszenz oder einer negativen Wirkung auf fluorophorhaltige Proben finden, während eine Beeinträchtigung der Fluoreszenz der DY-Moleküle durch die Verwendung von Formaldehyd bereits widerlegt werden konnte (¹¹¹, persönliche Mitteilung). Der Verdacht eines Zusammenhangs zwischen der geringen Signalintensität und der zuvor stattgefundenen Behandlung der fixierten Zellproben lässt sich also aufgrund des derzeitigen Wissensstandes nur partiell mit eindeutigen Fakten belegen.

Ebenso könnte ein geringes Vorkommen der Sonden in den Zellen als Folge schwacher Targetproteinexpression oder einer verminderten Bindungsfähigkeit der Sonde gegenüber ihrem Targetprotein Ursache der wenig intensiven Fluoreszenzsignale sein. Zusätzlich ist die Dye-Protein-Ratio der verwendeten Sonden mit der durchschnittlichen Bindung von 1,4 Fluorophormolekülen pro Antikörper relativ gering, was zu einer geringen Konzentration der Fluorophore führt (¹¹²). Eine Erhöhung der Signalintensität könnte in diesem Fall z.B. durch eine Steigerung der den Zellproben zugegebenen Sondenkonzentration mit dem Ziel der Sättigung aller Targetproteinbindungsstellen erzielt werden. Für die Markierung des Zellkerns wurde mit 0,5 µg/ml mit einer allgemein üblichen, vom Hersteller AppliChem

GmbH empfohlenen und in der Arbeitsgruppe etablierten Konzentration des Hoechst-Farbstoffes gearbeitet (¹¹³). Durch die Steigerung dieser Konzentration auf bereits für HL-60-Zellen mit Erfolg eingesetzte Hoechst-Konzentrationen von 5 µg/ml (¹¹⁴) oder 10 µg/ml (¹¹⁵) könnten ebenso möglicherweise signalstärkere Zellproben generiert werden.

Diese bereits beschriebenen Erklärungsansätze liefern mit Ausnahme des noch unbestätigten Einflusses der Probenbehandlung jedoch keine hinreichende Begründung für die gleichzeitige Schwäche des Kernfarbstoffes Hoechst sowie der Sonden und können daher nur partiell die Ursache der insgesamt festgestellten Signalschwäche der Proben sein. Dagegen wird der Effekt des Photobleaching prinzipiell bei allen Fluorophoren beobachtet und beschreibt bekanntermaßen den irreversiblen Abfall des Fluoreszenzsignals nach Exposition gegenüber dem Anregungslicht in dessen Folge die Sensitivität zur Detektion des Targets limitiert wird. Diese lichtinduzierten Zerfallsphänomene wurden in Arbeiten von ¹¹² hinsichtlich ihres unmittelbaren Zusammenhangs mit der Dye-Protein-Ratio fluorophorhaltiger Antikörper untersucht. Es wird hierbei von einem verstärkten Effekt des Photobleaching bei geringer Anzahl pro Antikörper gebundener Fluorophore berichtet, in dessen Folge die Fluoreszenzlebensdauer dieser Proben deutlich vermindert wird. Die Dye-Protein-Ratio der verwendeten Sonden ist mit 1,4 relativ niedrig, weswegen nach ¹¹² die schwache Signalintensität der Fluorophore mit dem verstärkten Einfluss des Photobleaching erklärbar wäre. Durch den Einsatz von bekanntermaßen gegenüber Photobleaching relativ stabilen Dyomics-Fluorophoren sowie der Detektion der Fluoreszenzsignale mittels probenschonender kamerabasierter Mikroskopie wurde in dieser Arbeit jedoch der Einfluss des Bleachingeffekts abgemindert. Eine weitere Maßnahme zur Reduktion des Photobleaching stellte die beim Axioplan 2 Imaging System heruntergesetzte Belichtungszeit von wenigen Mikrosekunden dar, wobei auch bei längerer Beobachtungszeit kein unmittelbares Bleichen der mit den Sonden inkubierten Zellproben beobachtet wurde.

Das schwache Fluoreszenzsignal vor allem der DY-782-Sonde könnte neben dem Bleaching Effekt auch durch die als Anregungslicht verwendete Quecksilberdampf Kurzbogenlichtquelle erklärt werden. Diese ist im Gegensatz zur z.B. beim MaestroTM-Fluoreszenz-Imager eingesetzten Xenonlampe, durch einen Abfall der Anregungsintensität bei Wellenlängen ab 700 nm gekennzeichnet (siehe Abbildung 4.6) und kann daher den DY-682 sowie den DY-782 nicht mit maximaler Signalstärke anregen.

Insgesamt bleibt die exakte Ursache für die beobachtete geringe Signalintensität der vermessenen Zellproben unklar, wobei die Verifikation der generierten Daten zur mikroskopischen Sondendarstellung in den HL-60eos- und BJ-Zellen durch einen Wiederholungsversuch noch aussteht und ein methodischer Fehler bezüglich der

Probenbehandlung und den eingesetzten Fluorophor- und Sondenmengen daher derzeit nicht auszuschließen ist. In fortführenden Untersuchungen ist eine Prüfung und Behebung der Ursache der geringen Signalintensität sowie die Optimierung des experimentellen Designs der mikroskopischen Darstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden anzustreben.

Die Annahme einer intrazellulären Lokalisation der Sonden basiert auf der Detektion der Sondenfluoreszenz ausschließlich in Kolo-kalisation mit den durch Hoechst-Kernfärbung markierten HL-60eos-Zellen und nicht im zellumgebenden Raum. Eine unspezifische Anlagerung der Sonden an Oberflächenstrukturen der Zelle durch z.B. Bindung über den Fc-Teil des IgG-Moleküls oder des Fluorophors selbst, kann hierbei durch die mitgeführten Kontrollen ausgeschlossen werden. In den hinsichtlich der Target-Protein-Expression negativ identifizierten BJ-Zellen konnte nach Inkubation mit den verschiedenen Sondenlösungen bei keiner der Proben ein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Im Falle vermehrter unspezifischer Bindungen der Sonden über den Fc-Teil der Antikörper, wäre sonst auch in diesen Ansätzen unabhängig von der Proteinexpression ein Sondensignal detektierbar. Neben diesem Ausschluss unspezifischer Sondenbindung über den Fc-Teil wurde mittels der als Negativkontrolle lediglich mit freiem Fluoreszenzfarbstoff (DY-505) inkubierten Zellen keine unspezifische Anlagerung der Fluorophore detektiert. Daher kann nicht von einem relevanten Effekt durch die Bindung freier Fluorophore an die Zellmembran bzw. an zelluläre Proteine (⁴⁷, ⁹⁰) auf die Ergebnisse der *in vitro* Darstellungen der Sonden ausgegangen werden.

Zur somit bestätigten intrazellulären Lokalisation der Sonde muss eine Aufnahme eben dieser in die Zellen unter Überwindung der Zellmembran erfolgt sein. Aufgrund der Fixierung der zur mikroskopischen Darstellung der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden verwendeten HL60-eos- und BJ-Zellen können phagozytotische Prozesse dieser Zellen ausgeschlossen werden, weswegen von einer Aufnahme der Sonde durch die Poren der zuvor mittels Tween 20[®] erfolgreich permeabilisierten Membran auszugehen ist. Für den zukünftigen Einsatz der Sonden *in vivo* sind jedoch fortführende Experimente zur Abklärung der Zugänglichkeit der Sonden in die perinukleären Bereiche der Zielzellen sowie der Untersuchung möglicherweise ablaufender Internalisierungsprozesse vitaler HL-60eos- und BJ-Zellen nötig (siehe Schlussfolgerungen und Ausblick, Seite 110).

Eine exakte Analyse der intrazellulären Lokalisation der Sonden war infolge des insgesamt schwachen Probensignals in Kombination mit der geringen Gesamtgröße sowie der hohen Kern-Plasma-Relation der HL-60eos Zellen nicht möglich. Dennoch lässt sich anhand der

Aufnahmen durch die mehrheitlich deckungsgleichen Signale der Sonden mit den Hoechst markierten Zellkernen ein bevorzugtes Vorkommen aller Sonden in perinukleären Bereichen der Zellen feststellen. Aufgrund der ebenfalls in perinukleärer Lokalisationen vorkommenden Targetproteine (¹⁶) wird somit die Hypothese einer stattgefundenen Bindung der Sonden an ihr entsprechendes Targetprotein 5-LO bzw. FLAP weiter bestätigt.

Bei den mikroskopisch untersuchten Zellproben dieser Arbeit mit den beschriebenen geringen Fluoreszenzsignalen würde auch eine weitere Optimierung technischer Parameter durch z.B. Steigerung der Gesamtvergrößerung bzw. der Auflösung des verwendeten Lichtmikroskops Axioplan 2 Imaging keinen weiteren Informationsgewinn bezüglich der exakten intrazellulären Lokalisation der Sonden ermöglichen. Auch nach der angestrebten Erhöhung der Signalintensität der Aufnahmen durch bereits beschriebene Verfahren, wäre lediglich eine etwa zweifache Verbesserung hinsichtlich der Auflösung möglich, da schon mit einem Trockenobjektiv mit einer numerischen Apertur (NA) von 0,75 gearbeitet wurde. Durch den Einsatz von Ölobjekiven mit noch höherer NA (1,4) konnten keine relevant besseren Ergebnisse erzielt werden, weil hierfür die Signale insgesamt zu schwach waren. Deshalb wurden alle mikroskopischen Aufnahmen aus Sicht einfacher Handhabung mit dem oben genannten Trockenobjektiv durchgeführt.

Die Verwendung gänzlich anderer Apparaturen wie eines Elektronenmikroskops zur Vermessung der Proben hätte den Vorteil eines 100- bis 1000-fach gesteigerten Auflösungsvermögens gegenüber dem verwendeten Lichtmikroskop. Es könnte neben den bekannten Nachteilen, wie der Entwässerung und Bedampfung der Proben, der Vermessung unter Hochvakuumbedingungen sowie der Forderung nach dünnen nicht lebenden Präparaten, vor allem wegen der aus technischen Gründen unmöglichen Detektion von Fluoreszenzsignalen jedoch nicht eingesetzt werden und somit nicht zur Besserung der Aufnahmequalität beitragen. Neben der leichten Abänderung technischer Parameter nach Erhöhung der Gesamtsignalstärke der Proben, könnte in weiterführenden Untersuchungen auch die selektive Anfärbung verschiedener Zellorganellen auf mikroskopischer Ebene Hinweise bezüglich der exakten Lokalisation der Sonden liefern. Hierfür sind auf dem Markt derzeit in vielfältigen Varianten fluoreszenzbasierte Reagenzien zur selektiven Anfärbung von Zellorganellen, (z.B. Endoplasmatisches Reticulum, Endosomen, Golgi-Apparat) Zellstrukturen (z.B. Zytoplasma) sowie Membranen verfügbar. Die Beurteilung einer möglicherweise vorliegenden Koloalisation der Sonden mit einer Fluorophor-markierten Zellstruktur, könnte hinweisend auf den exakten intrazellulären Aufenthalt der DY-IgG-Sonden sein. Jedoch könnte sowohl die mit 12 - 17 µm angegebene und in dieser Arbeit bestätigte geringe Größe der Zelle sowie die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von

¹¹⁶ und ¹¹⁷ ersichtliche hohe Kern-Plasma-Relation der HL-60eos-Zellen auch nach der Visualisierung weiterer Zellstrukturen zu Schwierigkeiten bezüglich der Beurteilung einer exakten Lokalisation der Sonden führen.

Auch ohne das detaillierte Wissen bezüglich der intrazellulären Sondenlokalisierung, konnten in dieser Arbeit die hergestellten spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden aufgrund der gelungenen Detektion der Fluoreszenzsignale für sämtliche eingesetzten Sondenlösungen in allen HL-60eos-Proben, sowie der Bestätigung der Kolo-kalisation der Sonden in den Zellen und der Spezifität dieser Sondenbindung, erfolgreich *in vitro* dargestellt werden. Aufgrund der einmaligen Durchführung dieses Experiments sind diese Ergebnisse jedoch als orientierend bezüglich der Eignung der hergestellten Sonden als spezifisches Kontrastmittel zur Entzündungsdetektion zu bewerten und sollten durch weiterführende Analysen validiert werden.

Eine Untersuchung der intrazellulär-lokalisierten Sonden hinsichtlich des FRET-Effekts konnte aufgrund technischer Limitationen nicht erfolgen da kein auf die freie Kombination von Filtern verschiedener Filtersets abgestimmter Strahlteiler zur Verfügung stand und der Einsatz der vorhandenen Strahlteiler das Anregungslicht nicht ausreichend ausblenden konnte. Somit konnte eine selektive Anregung des Donors bei isolierter Detektion der Donor- sowie Akzeptorfluoreszenz als eine entscheidende Voraussetzung zur Beurteilung des FRET-Effekts nicht realisiert werden. Auch die Vergleichbarkeit der Aufnahmen verschiedener Sonden war trotz gleicher Belichtungszeit aufgrund nicht einheitlicher Anregungs- und Detektionsbedingungen für die unterschiedlichen Sonden nicht gewährleistet. Dies liegt zum einen an den verschiedenen spektralen Eigenschaften von Lichtquelle und Kamera (siehe Abbildung 4.6), zum anderen an der nicht-identischen Lage von durch die Filtersätze bestimmten Anregungs- und Detektionsbanden zu den Absorptions- und Emissionsspektren der Sonden. Insbesondere die Anregungsintensität sinkt kontinuierlich von Hoechst über DY-505, DY-682 bis DY-782, wobei derzeit gerade die Bedingungen für die langfristig zur *in vivo* Anwendung ausgewählten NIR-Fluorophore (v.a. DY-782) besonders ungünstig sind. Dennoch lassen sich aus den mikroskopischen Aufnahmen der mit mehreren verschiedenen Sonden inkubierten Zellen einige entscheidende Erkenntnisse bezüglich der FRET-Eigenschaften *in vitro* ableiten.

So konnte zunächst durch die gemeinsame, fast deckungsgleiche Detektion des DY-682- sowie des DY-782-Sondensignals in einer HL-60eos-Zelle, eine Kolo-kalisation der Sonden und somit auch der Targetproteine nachgewiesen werden. Diese somit bestätigte bestehende räumliche Nähe der Sonden untereinander ist hinweisend für eine Interaktion der

Targetproteine 5-LO und FLAP im Bereich der Zellkernmembran nach Translokation der 5-Lipoxygenase vom Zytoplasma in perinukleäre Bereiche (¹⁰²). Mit dem Nachweis dieser engen räumlichen Beziehung der Sonden zueinander ist ein geringer Abstand der DY-682- zu den DY-782-Fluorophormolekülen wahrscheinlich, welcher nach ⁵⁹ eine wesentliche Voraussetzung für den erfolgreichen Energietransfer zwischen diesen an Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen im Rahmen eines ablaufenden FRET-Effekts darstellt. Ob hierbei ein für den Energietransfer im Rahmen von FRET nötiger Abstand der Fluorophormoleküle von 6,4 nm zwischen den DY-682-Donor- und DY-782-Akzeptorfluorophoren (⁷⁷) tatsächlich erreicht wurde muss hierbei in weiteren Untersuchungen des FRET-Effekts der spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden in Zellen analysiert werden.

Im Gegensatz zu den mikroskopischen Abbildungen der mit den Sonden des FRET-Paares inkubierten Zellproben zeigten die Aufnahmen der mit den spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden des Kontroll-Paares (DY-505/DY-782) behandelten Zellen lediglich ein Signal des potentiellen Donor-Fluorophors DY-505. Als Ursache des fehlenden Fluoreszenzsignals des DY-782-Farbstoffes kommen Quenchingprozesse in Frage, welche eine Reduktion des bereits bei den Zellproben mit alleiniger Inkubation der DY-782-Anti-FLAP-Sonden ermittelten schwachen Fluoreszenzsignals dieses Fluorophors durch zusätzliche gegenseitige Fluoreszenzauslöschungsphänomene unter die Detektionsgrenze des verwendeten Lichtmikroskops bewirkt haben könnten. Das Phänomen des im Gegensatz hierzu erfolgreich detektierten Signals der DY-782-Anti-FLAP-Sonde unter Anwesenheit der DY-682-Anti-5-LO-Sonde ist hinweisend auf einen stattgefundenen Energietransfer im Rahmen von FRET-Wechselwirkungen zwischen den Fluorophoren. Aufgrund des wahrscheinlich geringen Molekülabstandes der Sonden und somit auch der Farbstoffmoleküle bei einer Interaktion der Targetproteine könnte Energie des DY-682-Donor-Fluorophors auf das DY-782-Akzeptor-Fluorophor übertragen worden sein. Die Akzeptor-Fluoreszenz könnte erst als Resultat dieses Energietransfers die Sensitivität der mikroskopischen Apparatur überschritten haben und so zur Visualisierung auch dieser Sonde geführt haben. Aufgrund des nachweislich ausbleibenden FRET-Effekts beim Kontroll-Paar und der damit verbundenen fehlenden Steigerung des Akzeptorsignals war die Detektion der DY-782-Sonde in diesen Zellproben nicht möglich. Die erfolgreiche Detektion und Visualisierung aller spezifischen Sonden nach Inkubation der Zellen mit jeweils nur einer Sonde macht einen methodischen Fehler als Ursache des ausgebliebenen DY-782-Signals bei den mit den Sonden des Kontroll-Paares (DY-505/DY-782) inkubierten und ansonsten äquivalent behandelten Zellproben

unwahrscheinlich. Die Reproduktion der Daten in unabhängigen Wiederholungsversuchen zur Erhärtung dieser Annahmen stehen jedoch noch aus.

Die auf der Basis dieser Beobachtungen angestellten Spekulationen eines ablaufenden FRET-Effekts könnten durch die Vermessung der mit den spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden behandelten Zellen mit anderen, für diese Arbeit nicht zur Verfügung stehenden, technischen Apparaturen überprüft werden. Durch den Einsatz des NuanceTM-Gerätes als multispektrales, Mikroskopie-gestütztes Imaging-System, könnte analog zur Technik des MaestroTM-Fluoreszenz-Imagers, ein Nachweis des FRET-Effekts auch in Zellen und Geweben erfolgen (¹¹⁸). In Arbeiten von z.B. ¹¹⁹ konnte mittels des NuanceTM-Mikroskops bereits erfolgreich die Kollokalisierung verschiedener zellulärer Strukturen nach Auftrennung der Fluoreszenzspektren im Wellenlängenbereich von 460 - 660 nm bewiesen werden, wobei auch hier entsprechend der MaestroTM-Technik durch den variablen Einsatz der Filter eine Darstellung der verwendeten NIR-Fluorophore möglich wäre. Als weitere Technik zur Vermessung der Proben kommt die Fluorescence-Lifetime-Imaging-Microscopy (FLIM) in Frage, welche aufgrund konzentrationsunabhängiger Messungen der durchschnittlichen Fluoreszenzlebenszeit von Donormolekülen in An- und Abwesenheit von Akzeptormolekülen zum Nachweis des FRET-Effekts (¹²⁰) besonders in biologischen Geweben eine Alternative zu den konventionellen mikroskopischen Aufnahmen darstellt. Eine erfolgreiche Analyse von NIR-Fluorophoren bei *in vivo* Untersuchungen konnte mittels FLIM bereits durch ¹²¹ durchgeführt werden. Somit bieten die vorgestellten alternativen Verfahren zur Vermessung der Proben neben der Untersuchung des FRET-Effekts *in vitro* perspektivisch auch die Chance eines Live-Imagings zur Darstellung der Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen.

7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass das entwickelte Sondensystem die grundsätzlichen Voraussetzungen zur Darstellung von Entzündungsprozessen durch den Nachweis des FRET-Effekts basierend auf einer Interaktion zwischen 5-LO und dem aktivierenden Protein FLAP aufweist.

Bei der Charakterisierung der erfolgreich für die molekulare Bildgebung des Leukotrienstoffwechsels hergestellten Sonden konnte hierbei z.B. das grundsätzliche Vorliegen des FRET-Effekts sowie eine ausreichende Stabilität der Sonden über den Zeitraum von mindestens 3 Wochen eruiert werden. Anhand der anschließenden *in vitro* Analysen der FRET-Sonden, an das hinsichtlich dieser Untersuchungen als geeignet ermittelten Zellmodells, konnte neben der isolierten Detektion aller Sonden auch deren spezifische Bindung an ihre intrazelluläre Targetmoleküle nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit angestrebte Darstellung der FRET-Eigenschaften der hergestellten Sonden *in vitro* war mangels der gegenwärtigen Verfügbarkeit mikroskopischer Verfahren mit Eignung zur Detektion eines FRET-Effekts im NIR-Bereich nicht möglich. Das Vorliegen der prinzipiell für einen FRET-Effekt am Zellmodell *in vitro* erforderlichen Kriterien konnten jedoch auch hier aufgezeigt werden, weswegen durch die Vermessung der mit den spezifischen FLAP- bzw. 5-LO-Sonden behandelten Zellproben mittels neuartiger Verfahren wie z.B. dem NuanceTM-Fluoreszenz-Imager oder der Fluorescence-Lifetime-Imaging-Microscopy auch ein Nachweis des FRET-Effekts in Zellen *in vitro* gelingen sollte.

Für den klinischen Einsatz des Sondensystems als diagnostisches Werkzeug bei Entzündungsreaktionen ist in fortführenden *in vitro* sowie *in vivo* Untersuchungen zunächst eine weitere Charakterisierung der Sonden hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität, der Nachweis des FRET-Effekts *in vivo* sowie eine toxikologisches Screening notwendig, wobei die Zytotoxizität ausgewählter NIR-Fluorophore der Firma Dyomics bereits von ⁵⁶ untersucht und eine geringere zellschädigende Wirkung gegenüber dem bereits für klinische Untersuchungen anerkannten Fluorophor Indocyanin-Grün (ICG) festgestellt wurde. Ein weiterer wesentlicher Schritt auf dem Weg zur *in vivo* Darstellung von Inflammationen mittels des entwickelten Sondensystems ist die Untersuchung potentieller ablaufender Internalisierungsprozesse vitaler HL-60eos- und BJ-Zellen. Diese könnten durch den Einsatz unspezifischer Endozytosehemmer wie z.B. einer Mixtur aus Antimycin A, Natriumfluorid und Natriumchlorid (¹²²) sowie mit Cytochalasin D (¹²³) mit dem Ziel der Vermeidung einer intraphagosomalen Lokalisation der Sonden mit der Konsequenz einer Verhinderung deren Bindung an ihr Target unterbunden werden. Weiterhin ist die Suche nach einem geeigneten

Mechanismus zur Überwindung der Zellmembran beim Transfer der Sonde zu den im perinukleären Bereich des zytoplasmatischen Raumes lokalisierten Targetproteinen essentiell. Einen Lösungsansatz hierfür stellen die erstmals durch ¹²⁴ und ¹²⁵ beschriebenen so genannten cell-penetrating peptides (CPPs) dar, welche mit anderen Molekülen fusioniert werden können und die Fähigkeit zur Penetration der Zellmembran mit anschließender Translokation zum und in den Zellkern besitzen. Der Einsatz dieser Peptid-basierenden zellulären Transporter für Antikörper und andere Moleküle wurde unter anderem bereits erfolgreich für das TAT (Transactivator of the transcription)-Peptid mit potentieller Anwendung in der Radioimmuntherapie (¹²⁶) sowie für Transportan untersucht (¹²⁷).

Nach den beschriebenen weiterführenden Untersuchungen sowie der Optimierung der Sondereigenschaften, ist ein Einsatz des entwickelten Sondensystems als Kontrastmittel zur Detektion von Inflammationen in der Klinik mit den für die molekulare Bildgebung bekannten Vorteilen einer schonenden, nicht-invasiven, frühzeitigen und hochauflösenden optischen Darstellung denkbar. Durch die Entwicklung eines multifaktoriellen Kontrastmittelsystems aus weiteren NIR-Sonden mit anderen molekularen Zielstrukturen des Leukotrienstoffwechsels wie z.B. den Leukotrienrezeptoren CysLT1 (⁵⁷) sowie BLT1 (⁵⁸) könnte zusätzlich ein verbesserter Kontrast sowie eine spezifischere Darstellung inflammatorischer Prozesse erzielt werden.

Mit der Herstellung und Charakterisierung der FRET-Sonden DY-682-Anti-5-LO und DY-782-Anti-FLAP ist somit eine Basis geschaffen worden, auf deren Grundlage sich nach der Weiterentwicklung des Sondensystems ein breites diagnostisches sowie therapeutisches Anwendungsspektrum im humanen Organismus bietet. So ermöglicht die Detektion und exakte Lokalisation von Entzündungsprozessen zukünftig eine frühzeitig Diagnose und Therapie vor allem degenerativ-entzündlicher Erkrankungen wie z.B. Rheuma oder Morbus Bechterew und kann somit die Lebensqualität und -erwartung der Patienten erheblich verbessern. Weiterhin besteht die Möglichkeit mittels der entwickelten Sonden die vielfach beschriebenen (¹¹, ⁸) aber dennoch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismen der entzündungsbedingten Tumorgenese auf molekularer Ebene zu untersuchen. Exakte Kenntnisse bezüglich des Zusammenhangs zwischen dem Leukotrienstoffwechsel und der Tumorentstehung könnten zukünftig auch neue Ansätze für die Radio- oder Chemotherapie zur Behandlung dieser Tumoren liefern und damit einen wesentlichen Beitrag in der Bekämpfung der zweithäufigsten Todesursache leisten.

8 Literaturverzeichnis

1. Pschyrembel W, Dornblüth O. *Klinisches Wörterbuch*. Berlin: Walter de Gruyter-Verlag; 2007.
2. Lucignani G. Rubor, calor, tumor, dolor, functio laesa... or molecular imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Dec 2007;34(12):2135-2141.
3. Ferencik M. *Kompendium der Immunologie* Springer Verlag; 2006.
4. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. Mar 5 2002;105(9):1135-1143.
5. Schreiber S. Chronisch entzündliche Krankheiten - Von Krankheitsgenen zur genomischen Pathophysiologie. *medgen*. 31.01 2007;19:5-9.
6. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. Dec 19-26 2002;420(6917):860-867.
7. Porta C, Larghi P, Rimoldi M, et al. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*. 2009;214(9-10):761-777.
8. Shin VY, Jin HC, On Ng EK, Yiu Sung J, Chu KM, Cho CH. Activation of 5-lipoxygenase is required for nicotine mediated epithelial-mesenchymal transition and tumor cell growth. *Cancer Letters*. 2009;292(237-245).
9. Hong S, Lee HJ, Kim SJ, Hahm KB. Connection between inflammation and carcinogenesis in gastrointestinal tract: focus on TGF-beta signaling. *World J Gastroenterol*. May 7 2010;16(17):2080-2093.
10. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest*. May 2007;117(5):1155-1166.
11. Pidgeon GP, Lysaght J, Krishnamoorthy S, et al. Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev*. Dec 2007;26(3-4):503-524.
12. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. Jun 2010;10(6):427-439.
13. Duroudier NP, Tulah AS, Sayers I. Leukotriene pathway genetics and pharmacogenetics in allergy. *Allergy*. Jun 2009;64(6):823-839.
14. Egger G. *Die akute Entzündung - Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der unspezifischen Immunität* Wien: Springer Verlag; 2005.
15. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. Nov 30 2001;294(5548):1871-1875.
16. Woods JW, Evans JF, Ethier D, et al. 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J Exp Med*. Dec 1 1993;178(6):1935-1946.
17. Mandal AK, Jones PB, Bair AM, et al. The nuclear membrane organization of leukotriene synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 23 2008;105(51):20434-20439.
18. Patel N, Gonsalves CS, Yang M, Malik P, Kalra VK. Placenta growth factor induces 5-lipoxygenase-activating protein to increase leukotriene formation in sickle cell disease. *Blood*. Jan 29 2009;113(5):1129-1138.
19. Newcomer ME, Gilbert NC. Location, location, location: compartmentalization of early events in leukotriene biosynthesis. *J Biol Chem*. Aug 13 2010;285(33):25109-25114.
20. Reid G, Kargman S, Vickers P, et al. Correlation between expression of 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase, and cellular leukotriene synthesis. *J Biol Chem*. Nov 15 1990;265(32):19818-19823.

21. Jakobsson PJ, Odlander B, Steinhilber D, Rosen A, Claesson HE. Human B lymphocytes possess 5-lipoxygenase activity and convert arachidonic acid to leukotriene B₄. *Biochem Biophys Res Commun*. Jul 15 1991;178(1):302-308.
22. Feinmark SJ, Cannon PJ. Endothelial cell leukotriene C₄ synthesis results from intercellular transfer of leukotriene A₄ synthesized by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem*. Dec 15 1986;261(35):16466-16472.
23. Peters SP, Anthonisen N, Castro M, et al. Randomized comparison of strategies for reducing treatment in mild persistent asthma. *N Engl J Med*. May 17 2007;356(20):2027-2039.
24. Griffiths JR, Pettipher ER, Koch K, Farrell CA, Breslow R. Leukotriene B₄ plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. *Medical Sciences*. January 1995;92:517-521.
25. Hakonarson H, Thorvaldsson S, Helgadóttir A, et al. Effects of a 5-lipoxygenase-activating protein inhibitor on biomarkers associated with risk of myocardial infarction: a randomized trial. *JAMA*. May 11 2005;293(18):2245-2256.
26. Chen Y, Li D, Li S. The Alox5 gene is a novel therapeutic target in cancer stem cells of chronic myeloid leukemia. *Cell Cycle*. Nov 1 2009;8(21):3488-3492.
27. Trelle S, Reichenbach S, Wandel S, et al. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *BMJ*. 2011;342:c7086.
28. Berbari E, Mabry T, Tsaras G, et al. Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am*. Sep 1 2010;92(11):2102-2109.
29. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. Feb 11 1999;340(6):448-454.
30. Hellmich B, Merkel F, Weber M, Gross WL. [Early diagnosis of chronic systemic inflammatory disorders]. *Internist (Berl)*. Apr 2005;46(4):421-432.
31. Colombet I, Pouchot J, Kronz V, et al. Agreement between erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in hospital practice. *Am J Med*. Sep 2010;123(9):863 e867-813.
32. Hueber W, Utz PJ, Robinson WH. Autoantibodies in early arthritis: advances in diagnosis and prognostication. *Clin Exp Rheumatol*. Sep-Oct 2003;21(5 Suppl 31):S59-64.
33. Maraina CH, Nurdyana AK, Rusni D, Azwany Y. Diagnostic value of anti-modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. Oct 2010;13(4):335-339.
34. Csernok E, Lamprecht P, Gross WL. Clinical and immunological features of drug-induced and infection-induced proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibodies and myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibodies and vasculitis. *Curr Opin Rheumatol*. Jan 2010;22(1):43-48.
35. Grimm J, Wunder A. Current state of molecular imaging research. *Rofo*. 2005;177(3):326-337.
36. Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging. *Radiology*. May 2001;219(2):316-333.
37. Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*. 2007;96(1):1-26.
38. Reichert JM. Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *MAbs*. Jan-Feb 2011;3(1):76-99.

-
39. Roque AC, Lowe CR, Taipa MA. Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. *Biotechnol Prog.* May-Jun 2004;20(3):639-654.
 40. Gotthardt M, Bleeker-Rovers CP, Boerman OC, Oyen WJ. Imaging of inflammation by PET, conventional scintigraphy, and other imaging techniques. *J Nucl Med.* Dec 2007;51(12):1937-1949.
 41. Uddin MJ, Crews BC, Ghebreselasie K, Tantawy MN, Marnett LJ. [I]-Celecoxib Analogues as SPECT Tracers of Cyclooxygenase-2 in Inflammation. *ACS Med Chem Lett.* Feb 10 2011;2(2):160-164.
 42. Bremer C, Ntziachristos V, Mahmood U, Tung CH, Weissleder R. [Progress in optical imaging]. *Radiologe.* Feb 2001;41(2):131-137.
 43. Moussata D, Goetz M, Gloeckner A, et al. Confocal laser endomicroscopy is a new imaging modality for recognition of intramucosal bacteria in inflammatory bowel disease in vivo. *Gut.* Jan 2011;60(1):26-33.
 44. Kraft M, Betz CS, Leunig A, Arens C. Value of fluorescence endoscopy for the early diagnosis of laryngeal cancer and its precursor lesions. *Head Neck.* Nov 29 2010.
 45. Davis SC, Samkoe KS, O'Hara JA, et al. MRI-coupled fluorescence tomography quantifies EGFR activity in brain tumors. *Acad Radiol.* Mar 2010;17(3):271-276.
 46. Hilderbrand SA, Weissleder R. Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *Curr Opin Chem Biol.* Feb 2010;14(1):71-79.
 47. Licha K, Riefke B, Ntziachristos V, Becker A, Chance B, Semmler W. Hydrophilic cyanine dyes as contrast agents for near-infrared tumor imaging: synthesis, photophysical properties and spectroscopic in vivo characterization. *Photochem Photobiol.* Sep 2000;72(3):392-398.
 48. Mahmood U, Weissleder R. Near-infrared optical imaging of proteases in cancer. *Mol Cancer Ther.* May 2003;2(5):489-496.
 49. Giepmans BN, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science.* Apr 14 2006;312(5771):217-224.
 50. Hoogenboom JP, van Dijk EM, Hernando J, van Hulst NF, Garcia-Parajo MF. Power-law-distributed dark states are the main pathway for photobleaching of single organic molecules. *Phys Rev Lett.* Aug 26 2005;95(9):097401.
 51. Werner SG, Langer HE, Ohrndorf S, et al. Inflammation assessment in patients with arthritis using a novel in vivo fluorescence optical imaging technology. *Ann Rheum Dis.* Oct 12 2011.
 52. Fischer T, Ebert B, Voigt J, et al. Detection of rheumatoid arthritis using non-specific contrast enhanced fluorescence imaging. *Acad Radiol.* Mar 2009;17(3):375-381.
 53. Chopra A. Cy5.5-Conjugated anti-human CD31 monoclonal antibody. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database.* 2008.
 54. Klohs J, Grafe M, Graf K, et al. In vivo imaging of the inflammatory receptor CD40 after cerebral ischemia using a fluorescent antibody. *Stroke.* Oct 2008;39(10):2845-2852.
 55. Mordon S, Devoisselle JM, Soulie-Begu S, Desmettre T. Indocyanine green: physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo. *Microvasc Res.* Mar 1998;55(2):146-152.
 56. Pauli J, Vag T, Haag R, et al. An in vitro characterization study of new near infrared dyes for molecular imaging. *Eur J Med Chem.* Sep 2009;44(9):3496-3503.
-

57. Busch C, Passon M, Wenzel M, Socher I, Kaiser WA, Hilger I. Detection of leukotriene receptor CysLT1R in inflammatory diseases by molecular imaging with near-infrared fluorescence-based contrast agents. *Mol Imaging*. Apr 2011;10(2):81-90.
58. Paprotzki S. *Design und Charakterisierung von target spezifischen Sonden für Molekulare Bildgebung gegen den Leukotrien-Rezeptor BLT1* [Dissertation]. Jena: Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Friedrich-Schiller-Universität; 2011.
59. Förster T. *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz* 1948.
60. Wang Y, Shyy JY, Chien S. Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing. *Annu Rev Biomed Eng*. 2008;10:1-38.
61. Ogawa M, Regino CA, Choyke PL, Kobayashi H. In vivo target-specific activatable near-infrared optical labeling of humanized monoclonal antibodies. *Mol Cancer Ther*. Jan 2009;8(1):232-239.
62. Guo C, Dower SK, Holowka D, Baird B. Fluorescence resonance energy transfer reveals interleukin (IL)-1-dependent aggregation of IL-1 type I receptors that correlates with receptor activation. *J Biol Chem*. Nov 17 1995;270(46):27562-27568.
63. Cobos-Correa A, Trojanek JB, Diemer S, Mall MA, Schultz C. Membrane-bound FRET probe visualizes MMP12 activity in pulmonary inflammation. *Nat Chem Biol*. Sep 2009;5(9):628-630.
64. Sitrin RG, Emery SL, Sassanella TM, Blackwood RA, Petty HR. Selective localization of recognition complexes for leukotriene B4 and formyl-Met-Leu-Phe within lipid raft microdomains of human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol*. Dec 1 2006;177(11):8177-8184.
65. Luge T. *Charakterisierung eines FRET-Paares in vitro und Optimierung der Methode zum Nachweis von FRET-Effekten in der Molekularen Bildgebung* [Bachelorarbeit]. Jena: Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie 2009.
66. Schröter T. *Untersuchung eines FRET-Systems zur Darstellung von Entzündungsprozessen in vitro und in vivo mittels molekularer Bildgebung* [Dissertation]. Jena: Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Friedrich-Schiller-Universität 2011.
67. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. Jan 2003;60(5):523-533.
68. Lehmann. Frank. Dyomics GmbH, Otto-Schott-Straße 15, 07745 Jena. 2010.
69. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 1979;76(9):4350-4354.
70. Gultekin H, Heermann KH. The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem*. Aug 1 1988;172(2):320-329.
71. Green FJ. *The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators* Milwaukee: Aldrich Chemical Co; 1990.
72. Harper S, Speicher DW. Detection of proteins on blot membranes. *Curr Protoc Protein Sci*. May 2001;Chapter 10:Unit 10 18.
73. Nakamura K, Tanaka T, Kuwahara A, Takeo K. Microassay for proteins on nitrocellulose filter using protein dye-staining procedure. *Anal Biochem*. Aug 1 1985;148(2):311-319.
74. Richter G. *Praktische Biochemie (Grundlage und Techniken)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003.

75. Sasse J, Gallagher SR. Detection of proteins on blot transfer membranes. *Curr Protoc Immunol*. Nov 2008;Chapter 8:Unit 8 10B.
76. Vellonen KS, Mannermaa E, Turner H, et al. Effluxing ABC transporters in human corneal epithelium. *J Pharm Sci*. Feb;99(2):1087-1098.
77. Busch C, Schröter T, Grabolle M, et al. A new in vivo spectral multiplexing approach for the cooperative imaging of different disease-related biomarkers with NIR-fluorescent FRET probes. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2011.
78. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*. Nov 1995;4(11):2411-2423.
79. Tan C, Gajovic-Eichelmann N, Stocklein WF, Polzius R, Bier FF. Direct detection of Delta9-tetrahydrocannabinol in saliva using a novel homogeneous competitive immunoassay with fluorescence quenching. *Anal Chim Acta*. Jan 25 2009;658(2):187-192.
80. Hilger I, Leistner Y, Berndt A, et al. Near-infrared fluorescence imaging of HER-2 protein over-expression in tumour cells. *Eur Radiol*. Jun 2004;14(6):1124-1129.
81. Valdes-Aguilera O, Neckers D. Aggregation phenomena in xanthene dyes. *Acc Chem Res* 1989;22:171-.
82. Stellwagen E. Gel filtration. *Methods Enzymol*. 1990;182:317-328.
83. Schreiber G. Kinetic studies of protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol*. Feb 2002;12(1):41-47.
84. Sukumar M, Doyle BL, Combs JL, Pekar AH. Opalescent appearance of an IgG1 antibody at high concentrations and its relationship to noncovalent association. *Pharm Res*. Jul 2004;21(7):1087-1093.
85. Vermeer AW, Bremer MG, Norde W. Structural changes of IgG induced by heat treatment and by adsorption onto a hydrophobic Teflon surface studied by circular dichroism spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. Sep 16 1998;1425(1):1-12.
86. Ishikawa T, Ito T, Endo R, Nakagawa K, Sawa E, Wakamatsu K. Influence of pH on heat-induced aggregation and degradation of therapeutic monoclonal antibodies. *Biol Pharm Bull*. 2010;33(8):1413-1417.
87. Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy*. second ed. New York: Springer Science; 2004.
88. Rehm H, Letzel T. *Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics*. 6 ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
89. Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 1969;63(1):78-85.
90. von Wallbrunn A, Holtke C, Zuhlsdorf M, Heindel W, Schafers M, Bremer C. In vivo imaging of integrin alpha v beta 3 expression using fluorescence-mediated tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. May 2007;34(5):745-754.
91. Dixon RA, Diehl RE, Opas E, et al. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature*. Jan 18 1990;343(6255):282-284.
92. Steinhilber D. 5-Lipoxygenase: a target for antiinflammatory drugs revisited. *Curr Med Chem*. Jan 1999;6(1):71-85.
93. Radmark O, Samuelsson B. Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. May 21 2010;396(1):105-110.
94. Chen SH, Fahmi H, Shi Q, Benderdour M. Regulation of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase-activating protein/5-lipoxygenase by 4-

- hydroxynonenal in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(1):R21.
95. Martel-Pelletier J, Mineau F, Fahmi H, et al. Regulation of the expression of 5-lipoxygenase-activating protein/5-lipoxygenase and the synthesis of leukotriene B(4) in osteoarthritic chondrocytes: role of transforming growth factor beta and eicosanoids. *Arthritis Rheum.* Dec 2004;50(12):3925-3933.
96. Sawai M, Takase K, Teraoka H, Tsukada K. Reversible G1 arrest in the cell cycle of human lymphoid cell lines by dimethyl sulfoxide. *Exp Cell Res.* Mar 1990;187(1):4-10.
97. Marthyn P, Beuscart A, Coll J, Moreau-Gachelin F, Righi M. DMSO reduces CSF-1 receptor levels and causes apoptosis in v-myc immortalized mouse macrophages. *Exp Cell Res.* Aug 25 1998;243(1):94-100.
98. Siebenlist U, Bressler P, Kelly K. Two distinct mechanisms of transcriptional control operate on c-myc during differentiation of HL60 cells. *Mol Cell Biol.* Feb 1988;8(2):867-874.
99. Liu J, Yoshikawa H, Nakajima Y, Tasaka K. Involvement of mitochondrial permeability transition and caspase-9 activation in dimethyl sulfoxide-induced apoptosis of EL-4 lymphoma cells. *Int Immunopharmacol.* Jan 2001;1(1):63-74.
100. Birnie GD. The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br J Cancer Suppl.* Dec 1988;9:41-45.
101. Ngoka LC. Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers. *Proteome Sci.* 2008;6:30.
102. Strid T, Svartz J, Franck N, et al. Distinct parts of leukotriene C(4) synthase interact with 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 17 2009;381(4):518-522.
103. Paiva LA, Maya-Monteiro CM, Bandeira-Melo C, et al. Interplay of cysteinyl leukotrienes and TGF-beta in the activation of hepatic stellate cells from *Schistosoma mansoni* granulomas. *Biochim Biophys Acta.* Dec 2010;1801(12):1341-1348.
104. Lehner I, Niehof M, Borlak J. An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins. *Electrophoresis.* Jun 2003;24(11):1795-1808.
105. Ishihara K, Hong J, Zee O, Ohuchi K. Possible mechanism of action of the histone deacetylase inhibitors for the induction of differentiation of HL-60 clone 15 cells into eosinophils. *Br J Pharmacol.* Jul 2004;142(6):1020-1030.
106. Gombart AF, Kwok SH, Anderson KL, Yamaguchi Y, Torbett BE, Koeffler HP. Regulation of neutrophil and eosinophil secondary granule gene expression by transcription factors C/EBP epsilon and PU.1. *Blood.* Apr 15 2003;101(8):3265-3273.
107. Gery S, Gombart AF, Fung YK, Koeffler HP. C/EBP epsilon interacts with retinoblastoma and E2F1 during granulopoiesis. *Blood.* Feb 1 2004;103(3):828-835.
108. Wang H, Iakova P, Wilde M, et al. C/EBP alpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell.* Oct 2001;8(4):817-828.
109. Timchenko NA, Harris TE, Wilde M, et al. CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. *Mol Cell Biol.* Dec 1997;17(12):7353-7361.
110. Du J, Stankiewicz MJ, Liu Y, et al. Novel combinatorial interactions of GATA-1, PU.1, and C/EBP epsilon isoforms regulate transcription of the gene encoding eosinophil granule major basic protein. *J Biol Chem.* Nov 8 2002;277(45):43481-43494.
111. Hilger. Ingrid. Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Erlanger Allee 101, 07747 Jena-Lobeda. 2011.

112. Luchowski R, Matveeva EG, Gryczynski I, et al. Single molecule studies of multiple-fluorophore labeled antibodies. Effect of homo-FRET on the number of photons available before photobleaching. *Curr Pharm Biotechnol*. Oct 2008;9(5):411-420.
113. German J, Alhadeff B. Analysis of sister-chromatid exchanges. *Curr Protoc Hum Genet*. May 2001;Chapter 8:Unit 8 6.
114. Itoh T, Ito Y, Ohguchi K, et al. Eupalinin A isolated from *Eupatorium chinense* L. induces autophagocytosis in human leukemia HL60 cells. *Bioorg Med Chem*. Jan 15 2008;16(2):721-731.
115. Jegham H, Roy J, Maltais R, Desnoyers S, Poirier D. A novel aminosteroid of the 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol family induces cell cycle arrest and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Invest New Drugs*. Oct 2 2010.
116. Malm-Erfjelt M, Persson CG, Erfjelt JS. Degranulation status of airway tissue eosinophils in mouse models of allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Mar 2001;24(3):352-359.
117. Melo RC, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF. Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. *J Leukoc Biol*. Feb 2008;83(2):229-236.
118. Levenson RM, Mansfield JR. Multispectral imaging in biology and medicine: slices of life. *Cytometry A*. Aug 1 2006;69(8):748-758.
119. van der Loos CM. Multiple immunoenzyme staining: methods and visualizations for the observation with spectral imaging. *J Histochem Cytochem*. Apr 2008;56(4):313-328.
120. Liptonok SP, Borst JW, Mullen KM, van Stokkum IH, Visser AJ, van Amerongen H. Global analysis of Förster resonance energy transfer in live cells measured by fluorescence lifetime imaging microscopy exploiting the rise time of acceptor fluorescence. *Phys Chem Chem Phys*. Jul 21 2010;12(27):7593-7602.
121. Akers WJ, Berezin MY, Lee H, Achilefu S. Predicting in vivo fluorescence lifetime behavior of near-infrared fluorescent contrast agents using in vitro measurements. *J Biomed Opt*. Sep-Oct 2008;13(5):054042.
122. Simoes S, Slepishkin V, Duzgunes N, Pedrosa de Lima MC. On the mechanisms of internalization and intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes. *Biochim Biophys Acta*. Nov 1 2001;1515(1):23-37.
123. da Costa SR, Okamoto CT, Hamm-Alvarez SF. Actin microfilaments et al.--the many components, effectors and regulators of epithelial cell endocytosis. *Adv Drug Deliv Rev*. Nov 14 2003;55(11):1359-1383.
124. Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*. Dec 23 1988;55(6):1179-1188.
125. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. Dec 23 1988;55(6):1189-1193.
126. Hu M, Chen P, Wang J, Chan C, Scollard DA, Reilly RM. Site-specific conjugation of HIV-1 tat peptides to IgG: a potential route to construct radioimmunoconjugates for targeting intracellular and nuclear epitopes in cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Mar 2006;33(3):301-310.
127. Pooga M, Hallbrink M, Zorko M, Langel U. Cell penetration by transportan. *FASEB J*. Jan 1998;12(1):67-77.

9 Anhang

9.1 Lebenslauf

Name: Kempe
Vorname: Hanne
Geburtsdatum: 04. 04. 1988
Geburtsort: Jena
Familienstand: ledig
Nationalität: Deutsch

Schulausbildung

1994: Besuch der Inez Elementary School, Albuquerque (New Mexico)
1994 - 1996: Besuch der Public Elementary School 164, New York City
1996 - 1997: Besuch der Staatlichen Grundschule „Bergrat Voigt“, Ilmenau
1997 - 1998: Besuch der Staatlichen Grundschule 33, Schule am Griebnitzsee, Potsdam
1998 - 2002: Besuch des Staatlichen Gymnasium „Carl-Zeiss“, Jena
2002 - 2006: Besuch des Staatlichen Gymnasium „Carl-Zeiss“ im Spezialschulteil mit mathematisch- naturwissenschaftlich- technischer Ausrichtung, Jena
Juni 2006: Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife (Abiturgesamtnote 1,0)

Studium

Seit 2007: Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
September 2009: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion:

Februar 2010: Beginn der studiumsbegleitenden Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Hilger im Fachbereich der Experimentellen Radiologie des Universitätsklinikums Jena

Publikationen:

November 2011: „A new *in vivo* spectral multiplexing approach for the cooperative imaging of different disease-related biomarkers with NIR-fluorescent FRET probes“ - C. Busch; T. Schröter; M. Grabolle; M. Wenzel; H. Kempe; W. A. Kaiser; U. Resch-Genger; I. Hilger
Accepted in *The Journal of Nuclear Medicine*

9.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst bedanke ich mich bei dem Institutsdirektor Prof. Kaiser für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie.

Insbesondere gilt mein Dank Frau Prof. Hilger für die Bereitstellung dieses Themas, ihrer umfassenden Betreuung, den vielen fruchtbaren Diskussionen und wertvollen Ratschlägen, ohne die das Zustandekommen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders danken möchte ich meiner „Doktormutti“ Frau Dr. Franziska Dees für ihr unermüdliches persönliches Engagement und die tolle Betreuung sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch der Verfassung dieser Dissertation. Mit ihrer Geduld und Erfahrung hat sie die Arbeit stets vorangetrieben, konnte mit ihrem fundierten Fachwissen viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit geben, hatte immer ein offenes Ohr für alle anfallenden Probleme - und die passende Lösung parat - und ist mir auch persönlich unglaublich ans Herz gewachsen.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei allen Mitarbeitern der Experimentellen Radiologie, welche durch ihre herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und ihre fachliche sowie mentale Unterstützung während des gesamten Zeitraums der Erstellung dieser Dissertation ganz entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Bei Dr. Corinna Busch möchte ich mich für die Einarbeitung in die Thematik und die Erarbeitung von Konzepten zur Durchführung der Versuche bedanken. Von ganzem Herzen danke ich auch den „guten Seelen“ der Arbeitsgruppe Susann Burgold, Brigitte Maron, Julia Göhring, Doreen May, und Yvonne Heyne, welche vor allem bei den Zellkulturarbeiten eine unglaubliche Hilfe waren, bei Fragen jederzeit zur Stelle eilten und mit ihren ermutigenden Worten immer wieder Anschwung für die Erstellung dieser Promotion gegeben haben. Für die vielen wertvollen Ratschläge und die stete Hilfsbereitschaft möchte ich weiterhin Susanne Kossatz, Jana Hölzer, Ines Müller, Gabi Rimkus und allen weiteren, die hier unerwähnt geblieben sind, danken. Bei Jana Hölzer möchte ich mich hierbei zusätzlich auch für die mühevolle Arbeit des Korrekturlesens ganz herzlich bedanken. Meinen zahlreichen Mitdoktoranten Susanne Dietrich, Karolin Franke, Tom Schröter, Miriam Schäfer und Berit Schlothauer möchte ich ebenfalls herzlich danken für das tolle Arbeitsklima, die unglaubliche mentale Unterstützung sowie die vielen guten Ratschläge während der Promotionszeit.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Martin Forster (AG Pneumologie) für die Einweisung und Hilfestellungen bei der FACS-Durchflusszytometrie.

Mein Dank richtet sich auch an die Firma Dyomics GmbH und insbesondere Herrn Dr. Lehmann für die Bereitstellung der verwendeten Farbstoffe sowie die fachkundigen Auskünfte bezüglich des Umgangs mit ihnen.

Auch dem Bereich Corporate Research and Technology der Carl Zeiss AG möchte ich recht herzlich danken für die Möglichkeit der Nutzung des Axioplan-Fluoreszenzmikroskops und hierbei vor allem meinen Vater Dr. Michael Kempe für die fachliche Beratung und geduldige Unterstützung bei der mikroskopische Bildgebung und der Aufbereitung der Bilddaten.

Nicht zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Freunden und bei meiner gesamten Familie ohne deren uneingeschränkte Unterstützung, unermüdliche Geduld, und konstante Motivation diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

9.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. rer. nat. Ingrid Hilger, Frau Dr. Franziska Dees sowie Herr Dr. Michael Kempe,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 30.11.2011

Hanne Kempe, Verfasserin